



Produção de Biocombustíveis Líquidos a partir de Glicerina Não Refinada, num contexto de Biorrefinaria

Catarina Alexandra Martins Crespo Paula Lopes

Mestrado Integrado em Engenharia da Energia e do Ambiente

Dissertação orientada por:
Doutora Ana Cristina Ramos de Oliveira Justino (FCUL/LNEG)
Doutora Paula Cristina Lima Varela Passarinho (LNEG)

Agradecimentos

Em primeira instância quero agradecer às minhas orientadoras, Doutora Ana Cristina Oliveira e Doutora Paula Cristina Passarinho, por todos os ensinamentos, dedicação e disponibilidade prestada ao longo da investigação.

Ao Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG), pela cedência das suas instalações, equipamentos e materiais para a realização dos ensaios necessários neste estudo, e às empresas Iberol e Bio Oeste pelo fornecimento das matérias-primas utilizadas ao longo do trabalho.

A todos os membros integrantes na Unidade de Bioenergia, em especial ao Doutor Luís Ramalho pela ajuda na execução do método de determinação do teor em metanol, às Técnicas de Laboratório Graça Conceição e Natércia dos Santos e aos estagiários Mónica Morales, Alice Ferreira, Guiseppe Guarini, Narine Kalantaryan e Lusine Saghatelyan por toda a ajuda, incentivo e pelo bom ambiente de trabalho proporcionado durante o trabalho laboratorial.

À minha família e amigos um agradecimento muito especial, por me apoiarem em todas as minhas decisões académicas, por toda a compreensão, paciência, disponibilidade e, acima de tudo, por acreditarem sempre em mim incentivando-me a nunca desistir

Resumo

A presente dissertação teve como principal objetivo a produção de biocombustíveis líquidos a partir de glicerina não refinada proveniente de um processo de produção de biodiesel.

Foram cedidas para este trabalho 3 amostras diferentes de entre as quais se escolheu a que apresentava maior potencial para aproveitamento. Essa amostra apresentava um valor de pH de 12 e continha: glicerol ($70,6 \pm 0,6$ % m/m), sabões ($3,5 \pm 0,3$ % m_{oleato}/m), cinzas ($3,75 \pm 0,13$ % m/m), metanol ($23,96 \pm 0,02$ m/m) e água ($0,83 \pm 0,01$ m/m).

Para separar os ácidos gordos presentes na forma de sabões e enriquecer a fase aquosa em glicerol, foi realizado um processo de acidificação/neutralização seguido de separação das fases obtidas por centrifugação. Através de estudos de otimização do processo, e tendo em vista uma eventual aplicação industrial, concluiu-se que a adição de ácido clorídrico (HCl) para uma redução do valor de pH da glicerina não refinada para 5, permite obter uma fase rica em glicerol contendo 94,6% do original e uma fase orgânica contendo 75% de ácidos gordos livres (AGL).

Apesar de não ter existido aumento de pureza da fase contendo glicerina, este processo permitiu reduzir o nível de alguns parâmetros contaminantes de modo a possibilitar o seu uso como fonte de carbono em ensaios fermentativos de produção de etanol e de biomassa oleaginosa.

Com vista à produção de etanol foram realizados ensaios envolvendo diversas leveduras específicas inoculadas em meio contendo uma composição base de sais e extrato de levedura, ou apenas sais, e glicerina não refinada tratada a pH 5 com HCl numa concentração final de 7,5 g/L em glicerina. Os resultados destes ensaios foram comparados com ensaios semelhantes realizados com glicerina comercial pura (87%). Verificou-se que as leveduras *Pichia stipitis* e *Saccharomyces uvarum* apresentavam uma melhor capacidade de adaptação para conversão da glicerina tratada em biomassa. Contudo, o processo fermentativo não ocorreu de modo significativo tendo-se detetado concentrações mínimas de etanol (< 250 mg/L).

Na avaliação da viabilidade da produção de biomassa rica em óleo por conversão de glicerina proveniente da produção de biodiesel, verificou-se que as leveduras *Rhodospiridium toruloides* e *Rhodotorula mucilaginosa* apresentaram rendimentos de conversão em biomassa de aproximadamente 50%. Os teores de ácidos gordos presentes na biomassa no final do processo eram cerca de 20% do inicial, mostrando que a adaptação das células à glicerina ocorreu à custa de alteração no metabolismo de produção de lípidos.

Palavras-Chave: glicerina não-refinada, biodiesel, bioetanol, lípidos, leveduras

Abstract

The main goal of this work was the production of liquid biofuels from crude glycerine from biodiesel production.

Three different crude glycerine samples were obtained and characterized. Taking into consideration the potential for biofuels production, the sample chosen for the following studies was the sample containing $70.6 \pm 0.6\%$ m/m of glycerol, $3.5 \pm 0.3\%$ moleate/m of soaps, $3.75 \pm 0.13\%$ m/m of ash, $23.96 \pm 0.02\%$ m/m of methanol, $0.83 \pm 0.01\%$ m/m of water and a pH level of 12.

In order to separate the fatty acids, present in the soap form obtaining a glycerol rich phase, was carried out an acidification/neutralisation step followed by centrifugation to promote phase separation. Several studies to optimize the process for industrial scale application were performed. Addition of hydrochloric acid (HCl) until pH 5 revealed to be the best way to obtain a glycerine rich phase containing 94.6% of the original compound and an organic phase with 75% of free fatty acids (FFA) corresponding to a recovery of 59.4%. Although there was not observed an increase in the purity of the glycerine phase as expected, some important contaminant levels were reduced in the process allowing a posterior use of this material, as carbon source in ethanol fermentation and oleaginous biomass production assays.

Regarding the ethanol production, fermentative experiments were carried out with 4 different yeasts. The microorganisms were inoculated in media containing either inorganic salts and yeast extract or only inorganic salts and crude glycerine treated at pH 5 with HCl (final concentration – 7.5 g/L) as carbon source. The results obtained were compared to similar ones where technical grade commercial glycerine (87%) was used. It was found that the yeasts *Pichia stipitis* and *Saccharomyces uvarum* showed higher capability to use crude glycerine and grow. However, the fermentation ability seemed to be inhibited as no significant ethanol levels were detected in the medium (<250 mg / L).

Also, several experiments were performed to evaluate the feasibility of using crude glycerine to produce oleaginous biomass. It was observed that yeasts, such as *Rhodospiridium toruloides* and *Rhodotorula mucilaginosa*, were able to grow with a biomass conversion yield of around 50%. Nevertheless, the final fatty acid content in the cells was about 20% of the initial level, indicating that cell adaptation to crude glycerine resulted in changes in the lipid metabolism.

Keywords: crude glycerine, biodiesel, bioethanol, lipids, yeasts

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	II
Abstract	III
Índice.....	IV
Índice de Figuras	VI
Índice de Tabelas.....	VIII
Abreviaturas e Acrónimos.....	X
Capítulo 1 – Enquadramento teórico.....	1
Capítulo 2 – Estado da Arte	6
2.1. Biocombustíveis.....	6
2.2. Produção de biodiesel por (trans)esterificação.....	7
2.2.1. (Trans)esterificação de óleos/gorduras.....	9
2.2.2. (Trans)esterificação direta de biomassa microbiana	11
2.2.3. Matérias-primas.....	12
2.2.4. Propriedades/Qualidade do biodiesel	15
2.3. Produção de etanol por fermentação	17
2.3.1. Fermentação de substratos contendo açúcares	17
2.3.2. Processo integrado de fermentação	18
2.3.3. Matérias-primas.....	19
2.3.4. Propriedades/Qualidade do bioetanol.....	21
2.4. Glicerina.....	22
2.4.1. Caracterização físico-química	22
2.4.2. Produção Mundial	23
2.4.3. Produção de glicerina por transesterificação de óleos e gorduras	24
2.4.4. Pré-tratamento/Purificação da glicerina bruta	25
2.4.5. Valorização da glicerina.....	26
Capítulo 3 – Materiais e Métodos	29
3.1. Materiais.....	29
3.1.1. Glicerina não refinada	29
3.1.2. Microrganismos.....	29
3.1.3. Meios de cultura	30

3.1.4. Reagentes e equipamentos.....	31
3.2. Caraterização da glicerina não refinada	31
3.3. Pré-tratamento da matéria-prima.....	32
3.3.1. Acidificação da glicerina para separação dos ácidos gordos livres.....	33
3.3.2. Caraterização da glicerina não refinada pré-tratada	33
3.4. Ensaaios de fermentação.....	34
3.4.1. Produção de etanol	34
3.4.2. Produção de biomassa rica em óleo.....	35
Capítulo 4 – Resultados e Discussão.....	36
4.1. Caraterização físico-química da matéria-prima.....	36
4.2. Pré-tratamento da matéria-prima.....	39
4.2.1. Acidificação da glicerina para separação dos ácidos gordos livres.....	39
4.2.2. Caraterização da glicerina não refinada após tratamento	43
4.3. Ensaaios de fermentação.....	46
4.3.1. Produção de etanol	47
4.3.1. Produção de biomassa oleaginosa	53
Capítulo 5 – Conclusões e Trabalho Futuro	58
Capítulo 6 – Referências Bibliográficas.....	60
Anexo I – Reagentes.....	67
Anexo II – Equipamentos.....	69

Índice de Figuras

Figura 1.1- Consumo de energia final por setor em 2015 (adaptado de: Estatísticas do Ambiente, 2016).	1
Figura 1.2- Evolução mundial da produção de biocombustíveis líquidos (Adaptado de: REN 21 <i>Renewables Global Status</i> 2006-2017).	3
Figura 1.3- Produção de biocombustíveis na Europa (Adaptado de: REN 21 <i>Renewables Global Status</i> 2008-2017).	4
Figura 2.1 - Esquema simplificado da reação química de transesterificação (representando ROH o álcool e R', R'' e R''' as cadeias de ácidos gordos presentes na matéria-prima) (adaptado de: Wan <i>et al.</i> , 2015).	8
Figura 2.2- Reação de saponificação (Com R ₁ = ácidos gordos e R, = Na, K, etc) (adaptado de: Leung <i>et al.</i> , 2010).	9
Figura 2.3 - Esterificação de ácidos gordos livres (Com R = ácidos gordos, R' = Me ou Et) (adaptado de: Photaworn <i>et al.</i> , 2017).	10
Figura 2.4- Matérias-primas utilizadas em Portugal ao longo dos anos para produção de biodiesel (adaptado de: ENMC, 2017).	15
Figura 2.5- Reação química geral da fermentação alcoólica (adaptado de: Zabed, <i>et al.</i> , 2017).	17
Figura 2.6- Etapas metabólicas (glicólise e fermentação) envolvidas na produção de etanol (ADP- difosfato de adenosina, P _i -radical difosfato, ATP- trifosfato de adenosina, NAD- dinucleótido de nicotinamida e adenina) (adaptado de: El-Dalatony <i>et al.</i> , 2017).	18
Figura 2.7- Estrutura da glicerina (adaptado de: Kong <i>et al.</i> , 2016).	23
Figura 2.8- Cenário mundial da produção de glicerina bruta por transesterificação desde 2006.	24
Figura 2.9- Distribuição do consumo de glicerol em diferentes produtos e indústrias (adaptado de: Ardi <i>et al.</i> , 2015).	24
Figura 2.10- Vias metabólicas de conversão do glicerol para produção de vários compostos (adaptado de: Chen e Liu, 2016).	27
Figura 3.1- Amostras de glicerina não refinada utilizadas neste trabalho.	29
Figura 4.1- Efeito da acidificação numa amostra de glicerina não refinada (imagem da esquerda - glicerina não-refinada; imagem da direita-glicerina após acidificação e centrifugação; a) fase aquosa rica em glicerol, b) fase orgânica contendo ácidos gordos livres e c) precipitado de sais inorgânicos e outras impurezas).	41
Figura 4.2- Efeito do tipo de ácido na eficiência da neutralização a pH 6 de glicerina não refinada, para separação de AGL (■ - fase aquosa; ■ - fase orgânica) e glicerol (■ - fase aquosa).	41
Figura 4.3- Separação de fases numa amostra de glicerina não refinada acidificada a pH 6 após extração com hexano	42
Figura 4.4- Efeito do pH na eficiência da neutralização com HCl de glicerina não refinada para recuperação de AGL (■ - fase aquosa; ■ - fase orgânica) e glicerol (■ - fase aquosa)	43

Figura 4.5- Curvas de crescimento das leveduras <i>P. stipitis</i> (a), <i>S. uvarum</i> (b), <i>S. carlsbergensis</i> (c) e <i>S. bayanus</i> (d) em meios de fermentação contendo 7,5 g/L de glicerina como fonte de carbono.....	48
Figura 4.6- Consumo de glicerol por <i>P. stipitis</i> (a), <i>S. uvarum</i> (b), <i>S. carlsbergensis</i> (c) e <i>S. bayanus</i> (d) em ensaios de fermentação alcoólica usando glicerina não refinada tratada como fonte de carbono ...	51
Figura 4.7- Produção de etanol por <i>P. stipitis</i> (a), <i>S. uvarum</i> (b), <i>S. carlsbergensis</i> (c) e <i>S. bayanus</i> (d) em ensaios de fermentação alcoólica usando glicerina não refinada tratada como fonte de carbono ...	52
Figura 4.8- Curvas de crescimento das leveduras <i>R. toruloides</i> (●) e <i>R. mucilaginosa</i> (■) em meio de fermentação contendo 7,5 g/L de glicerol como fonte de carbono (biomassa _i = 100 mg/L; 30 °C; 150 rpm).	53
Figura 4.9- Quantidade de lípidos presente na biomassa de <i>R. toruloides</i> (●) e de <i>R. mucilaginosa</i> (■) ao longo do processo fermentativo (T=30°C; 150 rpm; biomassa _i = 100 mg/L; glicerol _i = 7,5g/L).	56
Figura 4.10- Variação da composição em ácidos gordos dos lípidos na biomassa de <i>R. toruloides</i> (●) e de <i>R. mucilaginosa</i> (■) ao longo do processo fermentativo (T=30 °C; 150 rpm; biomassa _i = 100 mg/L; glicerol _i = 7,5 g/L) (● C14:0; ● C16:0; ● C16:1; ● C18:0; ● C18:1; ● C18:2; ● C18:3; ● C24:0).	56

Índice de Tabelas

Tabela 2.1- Diferentes gerações de biocombustíveis: Vantagens e desvantagens, processo de produção e produtos (adaptado de: Dutta <i>et al.</i> , 2014).	7
Tabela 2.2- Percentagens típicas dos produtos obtidos na produção de biodiesel (transesterificação) (adaptado de: Wan <i>et al.</i> , 2015).	8
Tabela 2.3- Origem das matérias-primas, utilizadas para produção de Biodiesel-FAME (adaptado de: ENMC, 2017).	14
Tabela 2.4- Principais matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel (kton) em 2012 (adaptado de: ENMC, 2017).	14
Tabela 2.5- Especificações da norma europeia de qualidade do biodiesel EN 14214:2012 + A1 (2014).	16
Tabela 2.6- Origem das matérias-primas utilizadas na UE para produção de bioetanol (kton) em 2012 (adaptado de: ENMC, 2017).	21
Tabela 2.7- Requisitos aplicáveis e métodos de ensaio para o bioetanol definidos na EN 15376:2014	22
Tabela 2.8- Propriedades químicas e físicas da glicerina (adaptado de: Quispe <i>et al.</i> , 2013).	23
Tabela 2.9- Associação entre as características da glicerina não refinada e o processo de produção de biodiesel (Ardi <i>et al.</i> , 2015; Dhabhai <i>et al.</i> , 2016; Luo <i>et al.</i> , 2016; Marx, 2016; Muniru <i>et al.</i> , 2016; Pal e Chaurasia, 2016; Rodrigues <i>et al.</i> , 2016).	25
Tabela 3.1- Amostras de glicerina não refinada utilizadas neste trabalho.	29
Tabela 3.2- Microrganismos usados para produção de etanol e de biomassa oleaginosa	30
Tabela 3.3- Composição do meio de repicagem para leveduras.	30
Tabela 3.4- Composição base do meio de cultura (MC)	30
Tabela 4.1- Caracterização físico-química de amostras de glicerina não refinada (nd – não detetado).	36
Tabela 4.2- Composição em ácidos gordos da glicerina não refinada (amostra C).....	39
Tabela 4.3- Custo do processo de acidificação de glicerina não refinada.	42
Tabela 4.4- Caracterização da fase orgânica rica em AGL obtida após acidificação da glicerina não refinada (pH 5, HCl).....	44
Tabela 4.5- Caracterização físico-química da glicerina não refinada tratada por acidificação com HCl a pH 5.	45
Tabela 4.6- Valores de parâmetros de crescimento para diversas leveduras produtoras de etanol em meios com glicerina como fonte de carbono (T=30 °C; 150 rpm; biomassa _i = 100 mg/L; glicerol _i = 7,5g/L).....	49
Tabela 4.7- Valores de parâmetros de crescimento para as leveduras <i>R. toruloides</i> e <i>R. mucilaginosa</i> em meio com glicerina tratada com HCl a pH 5 como fonte de carbono (T=30°C; 150 rpm; biomassa _i = 100 mg/L; glicerol _i = 7,5g/L).....	54

Tabela 4.8- Rendimento em biomassa e concentração final de glicerol para ensaios de fermentação de leveduras oleaginosas em meio com 7,5 g/L de glicerina como fonte de carbono (T=30 °C; 150 rpm; biomassa _i = 100 mg/L).	55
Tabela I.1- Lista de reagentes químicos utilizados no decorrer do trabalho experimental (CG- cromatografia gasosa, FAME-determinação de ésteres metílicos de ácidos gordos, Q – método químico, HPLC- cromatografia líquida de alta pressão)	67

Abreviaturas e Acrónimos

AGL	Ácidos Gordos Livres
B7	Gasóleo com 7% de biodiesel
E10	Gasolina com 10% de etanol
EL	Extrato de levedura
EN	Norma Europeia
ENMC	Entidade Nacional para o Mercado de Combustíveis
EUA	Estados Unidos da América
FAME	Ésteres metílicos de ácidos gordos
GC	Glicerina comercial
GEE	Gases de Efeito de Estufa
Gli	Toer de glicerol
GT	Glicerina tratada
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HCl	Ácido clorídrico
HNO ₃	Ácido nítrico
HVO	Óleo vegetal hidrogenado
ILUC	Alteração indirecta do uso de solos
ISO	Organização internacional de normalização
LNEG	Laboratório Nacional de Energia e Geologia
MONG	Matéria Orgânica Não Glicerol
NaOH	Hidróxido de sódio
NP	Norma Portuguesa
OAU	Óleos Alimentares Usados
<i>P. stipitis</i>	<i>Pichia stipitis</i>
<i>R. toruloides</i>	<i>Rhodospiridium toruloides</i>
<i>R. mucilaginosa</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
S	Sais

<i>S. bayanus</i>	<i>Saccharomyces bayanus</i>
<i>S. uvarum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae I-uvarum</i>
<i>S. carlsbergensis</i>	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
SCO	Óleos de origem microbiana
THF	Tetrahidrofurano
UE	União Europeia
X	Teor de biomassa

Capítulo 1 – Enquadramento teórico

Ao longo dos anos, o consumo de energia tem vindo a aumentar drasticamente devido ao crescimento da população mundial, à procura de conforto, ao alargamento industrial e ao aumento do poder de compra e do consumo pessoal, agravando consequentemente problemas ambientais, tais como a geração de resíduos (Canesin *et al.*, 2014).

A segurança e a dependência energética, o aumento e a flutuação do preço do petróleo, o esgotamento dos recursos de combustíveis fósseis e as alterações climáticas a nível global são alguns dos maiores desafios que a sociedade enfrenta hoje e nas próximas décadas (Djurisic-Mladenovic *et al.*, 2016).

Um dos principais responsáveis pelo elevado consumo mundial de energia e de emissões de gases de efeito de estufa (GEE) é o setor dos transportes. Este setor representa, atualmente, cerca de 28% do consumo mundial de energia e 23% dos GEE (REN21, 2017).

Relativamente ao consumo final de energia por setor de atividade em Portugal, e comparando a estrutura nacional com a da União Europeia (UE28), constata-se que o setor dos transportes foi responsável em 2015 pela maior fatia do consumo final de energia quer em Portugal quer na UE28, 36,5% e 33,1%, respetivamente (**Figura 1.1**).

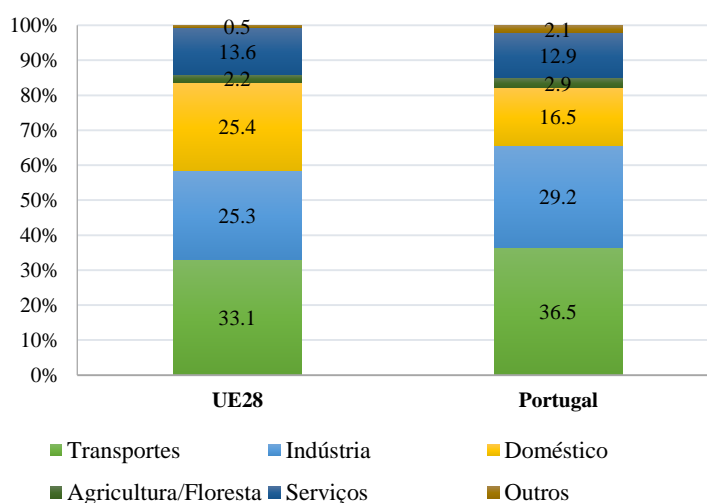


Figura 1.1- Consumo de energia final por setor em 2015 (adaptado de: Estatísticas do Ambiente, 2016).

Já em 2016, o setor dos transportes foi responsável por 42,0% do consumo final (36,5% em 2015), tendo ocorrido um aumento bastante significativo desse consumo (+20,6%).

No que concerne às emissões de GEE no nosso país, em 2015, o setor da energia manteve-se como principal setor emissor de GEE, representando 69,9% do total destas emissões (68,0% em 2014), das quais 23,5% foram da responsabilidade do setor dos transportes.

Atualmente, o gasóleo e a gasolina são os combustíveis derivados do petróleo mais utilizados a nível nacional, no setor dos transportes. A gasolina registou um decréscimo de 1,5% no consumo de 2015 para 2016, ao passo que o consumo de gasóleo registou novo aumento em 2016, correspondendo a uma

evolução positiva de 0,5%, face a 2015. O acréscimo relativo dos veículos a gasóleo deve-se não só a um aumento absoluto no número destes veículos em circulação, mas também a um decréscimo dos veículos a gasolina em circulação, que diminuiu 28,9 mil unidades entre 2015 e 2016 (INE, 2016).

Torna-se, portanto, imperativa a procura de fontes alternativas de energia que assegurem o desenvolvimento sustentável, reduzindo e substituindo o uso dos combustíveis derivados de petróleo, com a consequente redução das emissões de GEE. Das inúmeras fontes de energia renováveis passíveis de serem inseridas na matriz energética global, a bioenergia é uma fonte bastante promissora devido à abundância de matérias-primas e existência de tecnologias e infraestruturas de produção (Djurisic-Mladenovic *et al.*, 2016).

Nesse contexto, surgem os biocombustíveis que se apresentam como combustíveis renováveis, produzidos através de matérias-primas de origem biológica (biomassa). A utilização de biomassa para a obtenção de biocombustíveis é potencialmente atraente devido aos seus efetivos benefícios referentes à mitigação das alterações climáticas e à compatibilidade dos biocombustíveis com as condições dos atuais postos de abastecimento (Marx, 2016; Saladini *et al.*, 2016). Os biocombustíveis líquidos representam a principal fração das contribuições de energias renováveis para o setor de transportes, sendo que, em 2016, representaram cerca de 4% dos combustíveis mundiais para transporte rodoviário (REN21, 2017).

Em 2020, a União Europeia (UE) obriga, através da Diretiva 2009/28/CE, que 10% do combustível dos transportes rodoviários de todos os seus Estados-Membros tenha origem em fontes renováveis, como os biocombustíveis. Em Portugal, para o ano de 2018, a meta de incorporação para os biocombustíveis relativamente às quantidades de combustíveis colocadas no consumo manteve-se em 7,5% em teor energético conforme indicado no artigo 143º da Proposta de Lei 100/ XIII do Orçamento do Estado para este ano.

O biodiesel (FAME - ésteres metílicos de ácidos gordos) e o bioetanol são os biocombustíveis líquidos mais utilizados a nível mundial como substitutos, no setor dos transportes, dos combustíveis fósseis, gasóleo e gasolina, respetivamente (Su *et al.*, 2015).

Mais recentemente, surgiu o HVO (Hydrotreated Vegetable Oil ou óleo vegetal tratado hidrotermicamente), um biocombustível em cuja produção se utiliza hidrogénio para remoção do oxigénio presente nos triglicéridos de óleos vegetais, óleos alimentares usados (OAU) e outros resíduos de óleos vegetais ou gorduras animais (REN 21, 2016).

Ao longo dos anos, a produção de biocombustíveis líquidos tem seguido uma tendência oscilatória, sendo que, em 2016, a produção global de biocombustíveis líquidos, aumentou cerca de 2% em relação a 2015, atingindo um total de 135 milhares de milhões de litros (**Figura 1.2**). Esse aumento deveu-se principalmente a uma recuperação da produção de biodiesel, após um declínio em 2015, com um crescimento de 7,5% em 2016 na Indonésia e na Argentina e a aumentos significativos de produção na América do Norte (Estados Unidos da América (EUA) e Canadá) (REN21, 2017).

Em 2016, aproximadamente 72% da produção mundial de biocombustíveis (em termos energéticos) foi devida à produção de etanol, 23% a biodiesel e 4% referente a HVO. Os EUA e o Brasil foram e são os maiores produtores de biocombustíveis, representando entre eles 70% da produção mundial de todos os biocombustíveis, seguidos pela Alemanha, Argentina, China e Indonésia (REN21, 2017).

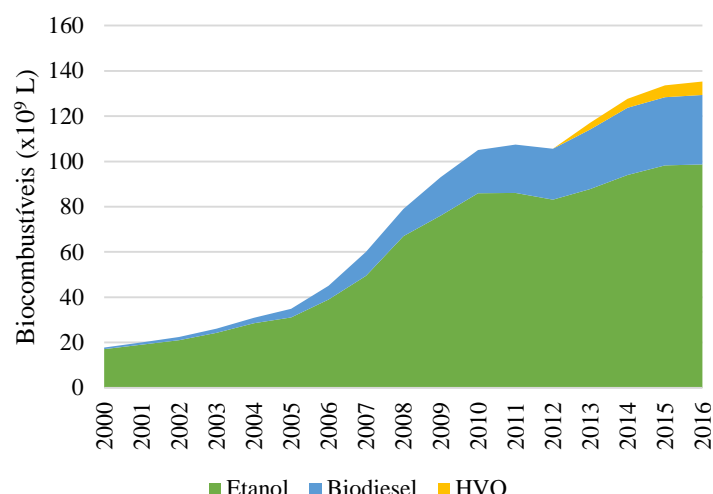


Figura 1.2- Evolução mundial da produção de biocombustíveis líquidos
(Adaptado de: REN 21 *Renewables Global Status* 2006-2017).

Na **Figura 1.2**, é também possível observar que a produção de biodiesel segue uma trajetória de crescimento semelhante à do bioetanol, com a diferença que este biocombustível é produzido em menor quantidade por ser substituto de gasóleo que, a nível mundial é menos utilizado que a gasolina, com exceção da EU. No entanto, a sua produção é geograficamente mais diversificada quando comparada com a do bioetanol.

Em 2018, a produção mundial de biocombustíveis deverá atingir cerca de 140 milhares de milhões de litros (**Figura 1.3**), o que corresponderá em termos energéticos ao fornecimento de 1,6 milhões de barris de petróleo/dia (ENMC, 2017).

Como mencionado, ao contrário do que acontece a nível mundial, o biodiesel é o biocombustível mais produzido e utilizado na Europa e, numa base energética, corresponde a 80% do total do mercado de biocombustíveis no setor dos transportes.

Em Portugal, e de acordo com as normas europeias de especificação (EN 590 para gasóleo e EN 228 para gasolina) e a legislação nacional (Decreto-Lei n.º 152-C/2017 de 11 de dezembro), o biodiesel pode ser incorporado no gasóleo convencional numa percentagem até 7,0% em volume (B7), enquanto o bioetanol pode ser incorporado na gasolina convencional em misturas até 10,0% em volume (E10). Esta incorporação de biocombustíveis em combustíveis fósseis deve realizar-se em condições que assegurem a sua qualidade e homogeneidade e permitam o cumprimento das especificações técnicas.

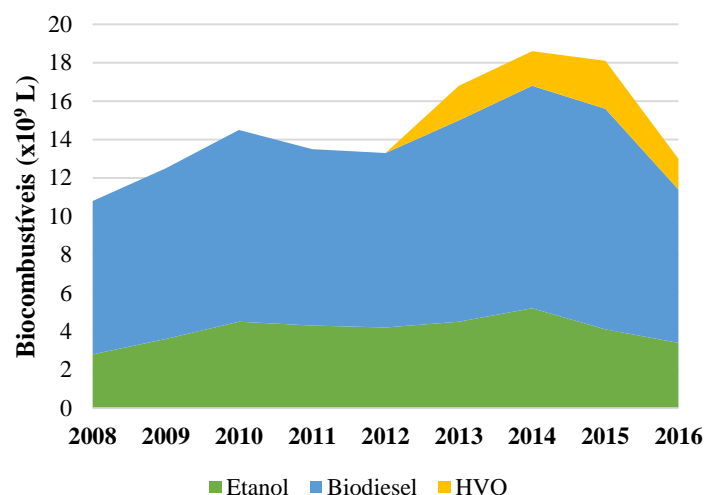


Figura 1.3- Produção de biocombustíveis na Europa
(Adaptado de: REN 21 *Renewables Global Status* 2008-2017).

Nos últimos anos, o crescimento e desenvolvimento da indústria de biocombustíveis tem conduzido a uma produção excedentária de matérias-primas residuais, tornando uma preocupação atual o destino final das mesmas. A integração destas matérias-primas nos processos de produção de energia renovável tem sido uma alternativa promissora na sua valorização, uma vez que não só beneficia esses processos como também auxilia a redução do custo e do impacto ambiental (Acheampong et al, 2017; Su *et al.*, 2015).

Por estas razões, têm sido aplicadas metas e bonificações para biocombustíveis obtidos a partir de matérias-primas não convencionais. De acordo com a Diretiva 28/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia, cada Estado-Membro deverá assegurar que, em 2020, a quota de energia proveniente de fontes renováveis em todos os modos de transporte represente, pelo menos, 10% do consumo final de energia nos transportes nesse Estado-Membro. A mistura com biocombustíveis é um dos métodos ao dispor dos fornecedores de combustíveis fósseis para reduzir a intensidade de gases com efeito de estufa neste setor.

Mais recentemente, a Diretiva ILUC (1513/2015) refere uma bonificação para biocombustíveis obtidos a partir de glicerina não refinada, a qual é um subproduto da produção de biodiesel com várias aplicações após refinação (produtos cosméticos, farmacêuticos, etc). Contudo, o elevado custo do processo de refinação, associado às elevadas quantidades de glicerina não refinada atualmente produzidas na indústria do biodiesel, faz com que se tenham vindo a procurar novas abordagens para a sua valorização, permitindo gerir o processo de produção de biodiesel de modo global de acordo com o conceito de biorrefinaria (He *et al.*, 2017).

Com vista a colmatar o declínio na procura e o aumento na oferta desta matéria-prima residual, poderá optar-se pela sua conversão em produtos de valor acrescentado, através de vias de conversão biológicas ou químicas com várias aplicações práticas no setor emergente da energia renovável (He *et al.*, 2017).

Com efeito, a integração da glicerina não refinada no processo de produção de energia pode ser uma alternativa promissora para a sua valorização, uma vez que, não só beneficia o processo, como também permite melhorar a sustentabilidade económica da indústria de biodiesel e reduzir os impactos ambientais associados à sua eliminação (Luo *et al.*, 2016).

É nestes termos que se torna crucial desenvolver trabalhos de investigação que levem a uma proposta de processos alternativos viáveis para a produção de biocombustíveis e que permitam o uso da glicerina não refinada.

Capítulo 2 – Estado da Arte

2.1. Biocombustíveis

Os biocombustíveis são combustíveis renováveis produzidos direta ou indiretamente a partir de biomassa, matéria-prima de origem biológica, excluindo o material incorporado em formações geológicas e transformado em fóssil. Estes são utilizados como fonte de energia, substitutos dos combustíveis fósseis, apresentando um reduzido impacto ambiental. O bioetanol e o biodiesel são os principais biocombustíveis utilizados e produzidos a nível mundial (Saladini *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2015).

Os biocombustíveis são geralmente agrupados em diferentes categorias, conhecidas como biocombustíveis de primeira, de segunda, de terceira e de quarta geração, dependendo das matérias-primas e da tecnologia de conversão utilizada para a sua produção (**Tabela 2.1**). Na primeira geração de biocombustíveis, estes são produzidos a partir de culturas alimentares, competindo com o ciclo de alimentos pela terra, água e outros recursos (Hayes *et al.*, 2015; Saladini *et al.*, 2016). Considera-se biodiesel de primeira geração o produzido a partir de óleos alimentares, tais como colza, soja, palma e girassol. O bioetanol de primeira geração é produzido a partir de amido do trigo ou do milho ou de açúcares simples contidos na cana-de-açúcar (Ahmad *et al.*, 2011; Hayes *et al.*, 2015).

De forma a reduzir a dependência de matérias-primas alimentares, tem sido necessária a procura de fontes alternativas não alimentares para a produção de biocombustíveis. Nesse sentido, apareceram os biocombustíveis de segunda geração que são produtos de base biológica provenientes de matérias-primas como a biomassa lenhocelulósica, matéria-prima agrícola e florestal que contém celulose, hemicelulose e lenhina, e resíduos produzidos por sistemas agrícolas e de processamento de alimentos, tais como OAU e gordura animal (Hayes *et al.*, 2015; Saladini *et al.*, 2016).

Os biocombustíveis de terceira geração são produzidos a partir de biomassa microbiana cultivada especificamente para este fim. As microalgas surgiram como uma das fontes alternativas mais promissoras devido à sua alta eficiência fotossintética para produzir biomassa e às suas maiores taxas de crescimento e produtividade em comparação com as culturas convencionais. O seu cultivo é mais facilitado do que em muitos outros tipos de plantas e podem gerar um maior rendimento de óleo para a produção de biodiesel ou de açúcares para a produção de etanol (Ahmad *et al.*, 2011; Hayes *et al.*, 2015; Miranda *et al.*, 2012; Saladini *et al.*, 2016).

Os biocombustíveis de quarta geração visam a produção de energia sustentável através da captura e armazenagem de dióxido de carbono (CO₂) usando culturas de algas geneticamente modificadas para a produção direta do biocombustível (Acheampong *et al.*, 2017).

Na **Tabela 2.1** encontram-se as principais vantagens e desvantagens, processo de produção e produtos das quatro gerações de biocombustíveis mencionadas.

Tabela 2.1- Diferentes gerações de biocombustíveis: Vantagens e desvantagens, processo de produção e produtos (adaptado de: Dutta *et al.*, 2014).

	1ª Geração	2ª Geração	3ª Geração	4ª Geração
Vantagens	Emissões de GEE baixas	Emissões de GEE baixas	Fácil cultivo e elevada velocidade de crescimento dos microrganismos	Elevada velocidade de crescimento das algas
	Tecnologia de conversão simples e de baixo custo	Uso de matéria-prima residual e culturas não alimentares	Sem competição com o setor alimentar	Sem competição com o setor alimentar
		Sem competição com o setor alimentar	Maior versatilidade (ex. uso de água residual)	Captura de CO ₂
			Captura de CO ₂ (usando algas)	
Desvantagens	Menor rendimento	Custos de pré-tratamento elevados	Consumo elevado de energia para o cultivo (mistura, filtração, centrifugação, etc)	Elevado custo do bioreator
	Competição com o setor alimentar	Avançada tecnologia para conversão da biomassa em biocombustíveis	Problemas de contaminação em sistemas abertos	Investimento inicial elevado
				Problemas de contaminação
Processo Tecnológicos	Transesterificação de óleos e gorduras	Pré-tratamentos físicos, químicos e biológicos da matéria-prima	Cultivo, colheita e eventual extração do óleo ou açúcar	Engenharia metabólica de algas
	Fermentação de açúcares	(Trans)Esterificação de óleos e gorduras	(Trans)Esterificação de óleos	Cultivo de algas e separação do produto
		Fermentação de açúcares	Fermentação de açúcares	
		Processos termoquímicos	Processos termoquímicos	
Biocombustíveis	Biodiesel, bioetanol, Biobutanol	Biodiesel, bioetanol, biobutanol, gás de síntese, biohidrogénio, metano		Biodiesel, bioetanol, biobutanol, biohidrogénio

2.2. Produção de biodiesel por (trans)esterificação

A produção de biodiesel ocorre, em geral, por transesterificação de uma matéria-prima (óleo ou gordura), o que consiste na reação reversível consecutiva entre glicéridos e um álcool, metanol ou etanol, na presença de um catalisador (ácido, básico ou enzimático), resultando na produção de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos gordos e glicerol. Esta conversão decorre em três passos, nos quais são formados, como intermediários, di- e mono-glicéridos, sendo que a reação estequiométrica exige três moles de álcool por uma mole de triglicérido (**Figura 2.1**) (Kurnia *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2016; Quispe *et al.*, 2013).

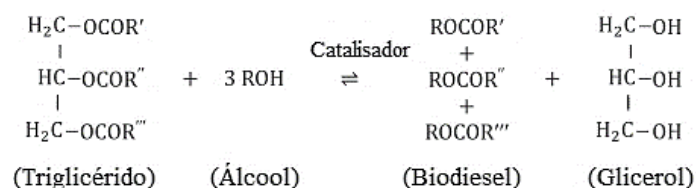


Figura 2.1 - Esquema simplificado da reação química de transesterificação (representando ROH o álcool e R', R'' e R''' as cadeias de ácidos gordos presentes na matéria-prima) (adaptado de: Wan *et al.*, 2015).

Na produção de biodiesel usa-se preferencialmente, como álcool, o metanol anidro, devido ao seu baixo custo, comparativamente ao etanol, e à maior facilidade de separação da glicerina, mesmo que se formem pequenas emulsões. No entanto, o metanol é tóxico e é produzido a partir de fontes fósseis, contrariamente ao etanol (Lima *et al.*, 2016; Marx, 2016).

Para completar, estequiometricamente, a reação de transesterificação seria necessária uma razão molar de metanol:triglicéridos de 3:1. No entanto, devido à natureza reversível da reação de transesterificação, são habitualmente usadas proporções significativamente mais elevadas (excesso de metanol) que deslocam a reação no sentido da formação de produto, permitindo a conversão completa dos triglicéridos. A proporção molar mais habitual é de 6:1 (metanol:triglicéridos) (Marx, 2016; Nouredin *et al.*, 2014).

A produção de biodiesel pode também resultar da conversão de ácidos gordos livres (AGL) num só passo de esterificação direta com o álcool.

Depois de terminada a conversão formam-se duas fases: a fase do biodiesel, constituída essencialmente por ésteres de ácidos gordos e glicéridos não convertidos, se a matéria-prima for rica em triglicéridos, e a fase da glicerina, contendo glicerina, sabões, metanol, catalisador e outras impurezas presentes na matéria-prima de origem. Estas fases encontram-se diferentemente posicionadas e bem definidas, devido às diferenças de densidade e polaridade. A fase do biodiesel por apresentar menor densidade e não possuir polaridade irá posicionar-se superiormente, ao passo que, a fase do glicerol, mais densa (mais pesada), tende a depositar-se inferiormente. Assim, a separação das fases faz-se através de sedimentação gravitacional seguida por decantação (Luo *et al.*, 2016; Marx, 2016; Nouredin *et al.*, 2014; Vávra *et al.*, 2017).

A quantidade de produtos obtidos pode variar consoante a composição da matéria-prima utilizada (**Tabela 2.2**). No entanto, geralmente, por cada 10 kg de biodiesel produzido obtém-se aproximadamente 1 kg de glicerina (Anuar e Abdullah, 2016; Quispe *et al.*, 2013).

Tabela 2.2- Percentagens típicas dos produtos obtidos na produção de biodiesel (transesterificação) (adaptado de: Wan *et al.*, 2015).

Produtos da transesterificação	Variação (%)
Biodiesel	90 – 91
Glicerol	9,0 – 9,6
Reagentes não consumidos (metanol, mono, di e triglicéridos)	0,4 – 1,0

Dado que o processo de transesterificação corresponde a uma reação reversível, cuja cinética é regida pelo princípio enunciado em 1888 pelo químico francês Henry Louis Le Châtelier, o rendimento da

reação dependerá do deslocamento do equilíbrio químico em favor da formação dos ésteres. Esta situação é conseguida, através da otimização de fatores dos quais depende a reação.

Os parâmetros operacionais que podem afetar a eficiência geral e o rendimento do processo de produção de biodiesel incluem: temperatura, humidade, quantidade de ácidos gordos livres (AGL) presentes na matéria-prima, proporção molar álcool:triglicéridos, tipo de catalisador, entre outros (Kurnia *et al.*, 2016).

2.2.1. (Trans)esterificação de óleos/gorduras

Na reação de transesterificação podem usar-se, na forma homogénea ou heterogénea, catalisadores básicos (alcalinos), ácidos ou enzimáticos. A escolha do tipo de catalisador é efetuada dependendo da quantidade de ácidos gordos livres presentes na matéria-prima a ser convertida.

Um catalisador homogéneo é um catalisador que se mantém na mesma fase (líquido) que os reagentes, ao passo que o catalisador heterogéneo permanece numa fase diferente (sólido, líquido imiscível ou gás) da dos reagentes durante a reação. Os catalisadores homogéneos originam contaminação do biodiesel e maior geração de resíduos, tornando a separação e a purificação do produto mais dispendiosas, ao passo que a separação do catalisador heterogéneo do produto, bem como a regeneração e a reutilização são mais fáceis de serem realizadas por este ser insolúvel no produto (Tan *et al.*, 2013).

2.2.1.1. Catálise básica

A transesterificação por catálise básica é o processo mais utilizado para a produção de biodiesel apresentando, normalmente, taxas de conversão bastante elevadas (98%) e utilizando para o efeito temperaturas relativamente baixas, pequenas quantidades de catalisador e um curto tempo de reação (Kayode e Hart, 2017).

Os catalisadores básicos são utilizados na reação de transesterificação de matérias-primas contendo maioritariamente triglicéridos e com baixos teores de ácidos gordos livres. Os catalisadores básicos homogéneos, hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de potássio (KOH), são os habitualmente mais utilizados na transesterificação. Todavia, a utilização de catalisadores heterogéneos, tais como, os alcóxidos de metais alcalinos, resulta em rendimentos mais elevados, com uma baixa concentração molar de catalisador e tempos de reação mais curtos. Contudo, o seu custo é bastante mais elevado (Luo *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2013). O uso de catalisadores básicos homogéneos apresenta algumas limitações, pois o catalisador não é reutilizável, podendo ainda ser consumido pela neutralização dos ácidos gordos livres contidos na matéria-prima (com formação de sabões) (**Figura 2.2**).

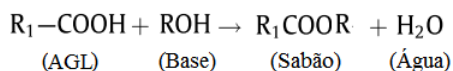


Figura 2.2- Reação de saponificação (Com R₁ = ácidos gordos e R₂ = Na, K, etc)
(adaptado de: Leung *et al.*, 2010).

Deste modo, a presença de ácidos gordos livres e água na matéria-prima, cujos valores recomendáveis não deverão ultrapassar 1% (equivalente a um índice de acidez de 2 mg KOH/g) e 0,1%, respetivamente, constituem as principais desvantagens para a catálise básica. A presença de água na matéria-prima

promove a hidrólise dos triglicéridos formando AGL cujo teor elevado afetará o rendimento em biodiesel devido à formação de sabões, com consumo de catalisador e redução da quantidade do produto éster (Halder *et al.*, 2015; Julianto e Suratmi, 2017; Photaworn *et al.*, 2017). A maior parte dos AGL saponificados fica localizada na fase da glicerina reduzindo, assim, a pureza da mesma e dificultando o processo de separação (Reşitoğlu e Keskin, 2017).

2.2.1.2. Catálise ácida

A transesterificação por catálise ácida é um processo menos utilizado por requerer tempos de reação mais longos. Contudo, é favoravelmente aplicada para converter matérias-primas contendo um elevado teor de ácidos gordos livres e água.

Usualmente, para a transesterificação homogênea usa-se um ácido, tal como ácido sulfúrico (H₂SO₄) ou ácido clorídrico (HCl). Recentemente tem sido estudado o uso de catalisadores ácidos heterogêneos sólidos para produção de biodiesel, como por exemplo, óxido de zircónio (ZrO₂) e óxido de titânio (TiO₂). Estes apresentam um forte potencial para substituir os catalisadores ácidos líquidos devido à sua reduzida sensibilidade ao teor de ácidos gordos livres, à fácil separação do catalisador do meio reagente, bem como a redução dos problemas de corrosão. Estes catalisadores promovem a reação de transesterificação sem perda de catalisador, resultando no aumento da pureza do glicerol (Tan *et al.*, 2013).

Em processos de transesterificação catalisados por ácido são necessárias condições reacionais mais severas, comparativamente à catálise básica, como uma elevada proporção molar álcool:óleo, maior tempo de reação e elevada temperatura de reação, para se obter um alto rendimento de biodiesel (Kayode e Hart, 2017). Porém, uma das vantagens da transesterificação em meio ácido é a possível conversão dos AGL em ésteres de alquila evitando a ocorrência da reação de saponificação, especialmente quando o teor de AGL é superior a 1% m/m. Essa conversão denomina-se esterificação (**Figura 2.3**), sendo necessário um álcool e um ácido para o efeito (Aranda *et al.*, 2008).

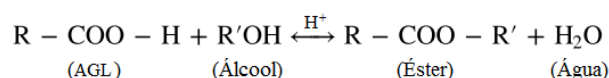


Figura 2.3 - Esterificação de ácidos gordos livres (Com R = ácidos gordos, R'=Me ou Et)
(adaptado de: Photaworn *et al.*, 2017).

Como referido, um dos principais fatores que influenciam a transesterificação catalisada por ácido é a relação molar álcool:óleo. Embora a formação de ésteres de metilo seja altamente favorecida pelo excesso de adição de metanol, esta maior quantidade de álcool dificulta, no entanto, a recuperação do glicerol produzido (Kayode e Hart, 2017).

Alguns autores demonstraram que a esterificação de ácidos gordos é uma reação mais rápida comparativamente à transesterificação de triglicéridos. Esta observação deve-se ao fato da esterificação de ácidos livres ocorrer num só passo, enquanto a transesterificação de triglicéridos consiste em três reações sucessivas (**Figura 2.1**), podendo também estar relacionada com a maior solubilidade de ácidos gordos em álcoois de baixa cadeia (Aranda *et al.*, 2008).

Em suma, para matérias-primas com quantidades significativas de AGL, obtém-se uma maior conversão na presença de catalisadores ácidos utilizando-se, na maioria das vezes, ácido sulfúrico como catalisador e metanol como álcool. No entanto, para uma conversão mais rápida, dever-se-á efetuar um processo

em dois passos, catálise ácida, para conversão dos AGL, seguida de básica, para conversão dos triglicéridos (Gangil *et al.*, 2015).

2.2.1.3. Catálise enzimática

Embora a produção de biodiesel seja habitualmente efetuada com catalisadores ácidos ou básicos, existem outros processos que têm sido desenvolvidos para a transesterificação de óleos e gorduras.

A transesterificação catalisada enzimaticamente tem sido desenvolvida para ultrapassar problemas associados à transesterificação catalisada por ácidos e bases, tais como, requisitos de alta energia, dificuldades na recuperação do catalisador e glicerol, e efeitos nocivos para o ambiente.

Através da transesterificação por catálise enzimática consegue-se obter um subproduto de elevada pureza (glicerina), uma fácil recuperação do produto (biodiesel) e uma possível reutilização do catalisador. No entanto, existem ainda grandes limitações à catálise enzimática quando implementada em escala industrial, tais como, o elevado custo das enzimas, uma velocidade de reação lenta e a ocorrência de desativação enzimática.

As enzimas são biocatalisadores eficazes devido à elevada especificidade para o substrato, grupo funcional, e especificidade estereoquímica em meio aquoso. Os biocatalisadores tornaram-se cada vez mais importantes para a indústria, uma vez que possuem uma elevada atividade específica e um baixo impacto ambiental. As lipases são enzimas amplamente utilizadas para catalisar reações de hidrólise, esterificação e transesterificação (Tan *et al.*, 2013). Na produção de biodiesel recorre-se, por exemplo, a lipases de *Mucor miehei* e de *Bacillus subtilis*.

2.2.1.4. Outros processos de transesterificação

A ausência de catalisador na transesterificação de triglicéridos, utilizando um álcool supercrítico, tal como metanol, etanol, propanol ou butanol, tem provado ser um processo promissor para a produção de biodiesel. As opções não catalíticas são projetadas para superar o tempo de latência da iniciação da reação devido à reduzida solubilidade do álcool na fase dos triglicéridos. Contudo, neste método são necessárias condições supercríticas de reação, isto é, temperaturas entre 350-400°C e 25-40MPa de pressão, que acarretam grandes custos de aquecimento e arrefecimento, e de equipamento. As elevadas proporções de metanol:óleo necessárias nestas condições (geralmente estabelecidas em 42) envolvem também elevados custos de evaporação do metanol por reagir (Mishra e Goswami, 2017).

Outro método para a transesterificação de óleos/gorduras é a utilização de um co-solvente, o tetrahidrofurano (THF), que atua solubilizando o metanol. Com esta técnica, a duração da reação diminui para 5-10 min, não existindo resíduos de catalisador nas fases éster ou glicerol. O THF como co-solvente é escolhido pelo facto do seu ponto de ebulição ser muito próximo ao do metanol. Este método requer uma temperatura de apenas 30 °C (Mishra e Goswami, 2017).

2.2.2. (Trans)esterificação direta de biomassa microbiana

Os processos convencionais de (trans)esterificação, mencionados anteriormente, requerem a extração prévia dos lípidos a partir da biomassa, os quais são posteriormente processados tradicionalmente para

produzir biodiesel. Já a designação *in situ* ou direta refere-se ao uso da biomassa rica em lípidos, sem extração prévia, permitindo que a reação de (trans)esterificação ocorra sobre a matriz sólida, sendo por isso também denominada como extração reativa.

Assim, torna-se cada vez mais recorrente efetuar a produção de biodiesel a partir do processo de (trans)esterificação direta ou *in situ*, uma vez que eliminar as etapas de extração do óleo não só reduz os passos de processamento, mas também pode resultar numa diminuição do custo de investimento inicial e dos custos de processo.

O processo a selecionar para a (trans)esterificação direta terá de ser uma catálise ácida devido ao elevado teor em humidade da biomassa. Assim, haverá sempre que ponderar a necessidade de extração e o seu custo *versus* temperatura e lentidão da catálise ácida (Go *et al.*, 2016).

Alguns autores mostraram já que através da (trans)esterificação por catálise ácida é possível efetuar uma eficiente extração reativa de biomassa microbiana oleaginosa. Os conteúdos lipídicos de três diferentes biomassas oleaginosas, *Lipomyces starkeyi*, *Mortierella isabellina* e *Rhodospiridium toruloides*, foram, por exemplo, já convertidos com sucesso para FAME com rendimentos de 97, 91 e 98%, respetivamente (Kasim *et al.*, 2010).

2.2.3. Matérias-primas

As matérias-primas para a produção de biodiesel estão divididas em quatro categorias: óleos vegetais alimentares (ex: colza, soja, amendoim, girassol, palma e coco), óleos vegetais não alimentares (ex: *jatropha*, algas), resíduos ou óleos alimentares usados e, por fim, gorduras animais (ex: sebo de carne bovina, gordura de frango e óleos de peixe) (Mishra e Goswami, 2017).

No caso de culturas, a disponibilidade e composição destas matérias-primas são dependentes da localização geográfica, condições climáticas, características e condições locais do solo e práticas agrícolas.

2.2.3.1. Óleos Vegetais

As matérias-primas tradicionais para a indústria do biodiesel são constituídas na sua grande maioria por triglicéridos que, por sua vez, resultam da combinação de uma molécula de glicerol unida por ligações éster a três ácidos gordos de cadeia longa (Gao *et al.*, 2016). A natureza físico-química dos óleos e gorduras é determinada principalmente pela sua composição, nomeadamente pelo comprimento da cadeia e grau de insaturação dos ácidos gordos (Pacheco *et al.*, 2014).

Predominantemente, os ácidos gordos presentes em óleos e gorduras vegetais são compostos saturados e insaturados com cadeias alifáticas lineares. Um número par de átomos de carbono, de 16 a 18, com um único grupo carboxilo, é o mais comum. No entanto, alguns ácidos gordos menores podem ainda estar presentes, incluindo uma pequena quantidade de ácidos de cadeia ramificada, cíclica ou com número de átomos de carbono ímpar (Kostik *et al.*, 2013).

Em geral, quanto maior o grau de insaturação dos ácidos gordos em óleos vegetais, mais suscetíveis estes são à deterioração oxidativa. Os ácidos gordos de cadeia curta têm um ponto de fusão mais baixo e são mais solúveis em água, assim como os ácidos gordos não saturados têm um ponto de fusão inferior em comparação com o dos ácidos gordos saturados de comprimento de cadeia semelhante (Kostik *et al.*,

2013). Os ácidos gordos presentes em óleos vegetais e gorduras animais são, em geral, os ácidos palmítico (16:0), esteárico (18:0), mirístico (14:0), palmitoleico (C16:1), oleico (18:1), linoleico (18:2), linolénico (18:3), araquídico (20:0), beénico (22:0) e lignocérico (24:0) (Mahmudul *et al.*, 2017).

2.2.3.2. Óleos de origem microbiana

Como anteriormente referido, as matérias-primas para a produção industrial de biodiesel são usualmente óleos ou gorduras de fonte vegetal ou animal. Porém, existem também microrganismos (bactérias, fungos, algas e leveduras) metabolicamente capazes de produzir e armazenar lípidos em grandes quantidades. Os lípidos obtidos a partir de fontes microbianas são denominados *Single cell oils* (SCOs) (Munch *et al.*, 2015; Polburee *et al.*, 2015; Spier *et al.*, 2015).

Dos diferentes microrganismos, as leveduras oleaginosas têm recebido um especial interesse devido à sua capacidade de crescer rapidamente atingindo elevadas densidades numa variedade de fontes de carbono (substratos), entre as quais se incluem matérias-primas residuais de baixo custo provenientes da agricultura e da indústria. No geral, as células das leveduras oleaginosas são capazes de acumular lípidos celulares em quantidades superiores a 20% da sua biomassa quando cultivadas em meios com excesso de carbono disponível, mas quantidades limitadas de outros nutrientes, especialmente azoto. Os lípidos produzidos são constituídos maioritariamente por ácidos gordos insaturados de cadeia longa, com 16-18 carbonos, semelhante à composição de alguns óleos vegetais (Leiva-Candia *et al.*, 2014; Munch *et al.*, 2015; Spier *et al.*, 2015).

Estudos já realizados indicam, por exemplo, que as leveduras dos géneros *Yarrowia*, *Rhodospiridium* e *Rhodotorula*, conseguem produzir maior quantidade de lípidos, utilizando por exemplo a glicerina como fonte de carbono (Polburee *et al.*, 2015)

Para além das leveduras, as algas têm também sido utilizadas na produção de biodiesel, uma vez que, são uma fonte de biomassa versátil. Por exemplo, num estudo realizado com as microalgas *Neochloris oleoabundans* e *Nannochloropsis* sp., obtiveram-se teores de óleo da ordem de 29% (Gouveia e Oliveira, 2009).

2.2.3.3. Distribuição mundial de matérias-primas

Das matérias-primas passíveis de serem inseridas na produção de biodiesel, os óleos vegetais (soja, colza e palma) são os mais usados pelos principais países produtores deste biocombustível. Deste modo, a distribuição mundial de matérias-primas tem origem em diferentes países do globo (**Tabela 2.3**).

Os principais países produtores de biodiesel, no ano de 2016, foram os EUA com 18% da produção global, Brasil (12%) e Indonésia, Alemanha e Argentina (cada um com 10%) (REN21, 2017). As matérias-primas mais utilizadas por estes países foram: óleo de soja (Argentina, Brasil e EUA) e óleo de palma (Indonésia) (**Tabela 2.3**) (ENMC, 2017).

Tabela 2.3- Origem das matérias-primas, utilizadas para produção de Biodiesel-FAME (adaptado de: ENMC, 2017).

Matérias-primas	País de origem
Soja	Brasil, Canadá, Paraguai, Ucrânia, EUA, Espanha, Moldávia e Bolívia
Colza	Canadá, EUA, Ucrânia, Bulgária, Rússia, Holanda, Argentina, Espanha e Reino Unido
Oleína de Palma	Indonésia e Malásia
Girassol	Espanha

No entanto, resíduos agrícolas (de origem animal e vegetal), industriais, de restauração e domésticos, também fornecem recursos para a produção de biodiesel. A utilização deste tipo de matérias-primas residuais poderá reduzir o custo do biodiesel e evitar a utilização de matérias-primas que possam competir com o setor alimentar.

As matérias-primas residuais têm vindo a representar importantes oportunidades no mercado para a produção do biodiesel, principalmente na Europa onde a introdução de matérias-primas residuais (OAU e gorduras animais) no processo tem vindo a aumentar, dado que a sua contribuição para a quota de energia proveniente de fontes renováveis é considerada de dupla contagem, isto é, contabilização de duas vezes o seu teor energético (Diretiva 1513/2015 de 9 de setembro). No entanto, na Europa, o óleo de colza tem sido a matéria-prima dominante na produção de biodiesel (**Tabela 2.4**) tendo representado 49% da produção total em 2015. Para além dos óleos alimentares usados e das gorduras animais, outras matérias-primas residuais podem igualmente usufruir do benefício acima mencionado, entre elas a glicerina não refinada proveniente, por exemplo, de um processo de produção de biodiesel.

Tabela 2.4- Principais matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel (kton) em 2012 (adaptado de: ENMC, 2017).

País	Matérias-primas							Total
	Óleo de colza	Óleo de soja	Óleo de palma	Óleo de girassol	Gordura	OAU	Outros	
UE*	5,095	386	-	133	477	932	99	7121 (61,24%)
Indonésia	1	-	1367	-	-	24	-	1392
Argentina	11	1345	-	-	-	1	-	1357
Austrália	364	-	-	-	-	1	-	364
Canadá	261	32	-	-	-	1	-	294
Malásia	2	2	207	-	-	5	-	216
Ucrânia	132	15	-	-	-	-	-	147
EUA	33	57	-	-	3	32	2	127
Rússia	105	21	-	-	-	1	-	127
Brasil	-	112	-	-	-	2	-	115
Africa do Sul	-	66	-	-	-	1	-	68
Outros	127	90	9	-	-	55	18	300
Total	6129	2172	1583 (13,6%)	133	481	1056	119	11628

Em Portugal e à semelhança de muitos outros países, as matérias-primas mais utilizadas para a produção de biodiesel têm sido os óleos vegetais virgens (óleo de colza e de soja, e a oleína de palma). O perfil das matérias-primas utilizadas varia ao longo do ano, sendo o óleo de colza mais usado nos meses mais frios do ano (dezembro a abril), substituído nos restantes meses do ano pelo óleo de soja. Em 2016, aproximadamente 45% das matérias-primas utilizadas no nosso país eram de origem residual (OAU e gordura animal) (**Figura 2.4**).

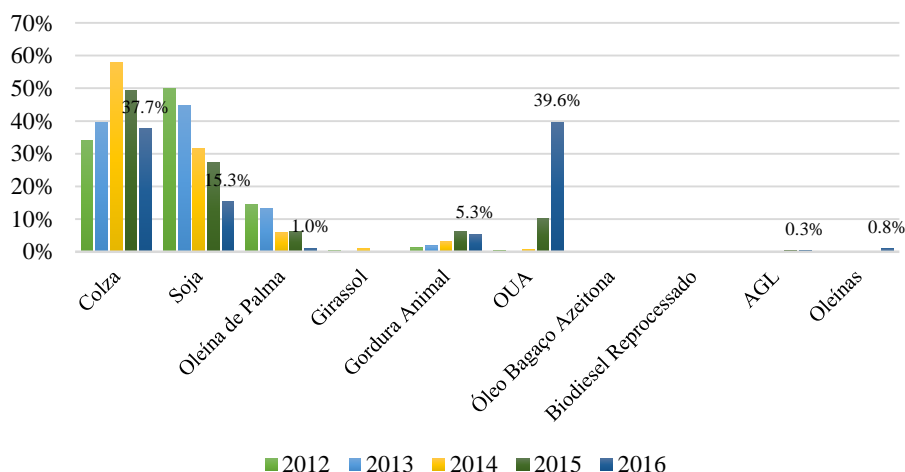


Figura 2.4- Matérias-primas utilizadas em Portugal ao longo dos anos para produção de biodiesel
(adaptado de: ENMC, 2017).

2.2.4. Propriedades/Qualidade do biodiesel

Como tem sido mencionado, a produção de biodiesel pode ser efetuada recorrendo a diversas matérias-primas, originando assim um produto final com diferentes propriedades. Diversas propriedades físicas e químicas do biodiesel estão diretamente ligadas com a matéria-prima utilizada na sua produção, principalmente com a composição em ácidos gordos da mesma e com o álcool utilizado no processo de transesterificação (Rajagopal *et al.*, 2016).

Para que se possa garantir a qualidade do biodiesel, este tem de cumprir determinadas especificações. Na Europa, e consequentemente em Portugal, a norma EN 14214:2012 + A1 (2014), estabelece os limites para os vários parâmetros físicos e químicos e descreve quais as normas de ensaio a serem utilizadas para a avaliação desses mesmos parâmetros (**Tabela 2.5**).

Um biodiesel que não cumpra os requisitos desta norma, isto é, que não apresente qualidade suficiente, poderá originar problemas no motor do veículo e noutros componentes do sistema do combustível em que for utilizado.

Tabela 2.5- Especificações da norma europeia de qualidade do biodiesel EN 14214:2012 + A1 (2014).

Parâmetro	Unidade	Limites legais		Métodos
		Mínimo	Máximo	
Teor em éster	% (m/m)	96,5	-	EN 14103
Densidade a 15 °C	kg/m ³	860	900	EN ISO 3675 EN ISO 12185
Viscosidade a 40 °C	mm ² /s	3,50	5,00	EN ISO 3104
Ponto de inflamação	°C	101	-	EN ISO 2719 EN ISO 3679 EN ISO 20846
Teor em enxofre	mg/kg	-	10,0	EN ISO 20884 EN ISO 13032
Número de cetano	-	51,0	-	EN ISO 5165
Teor em cinzas sulfatadas	% (m/m)	-	0,02	ISO 3987
Teor em água	mg/kg	-	500	EN ISO 12937
Contaminação total	mg/kg		24	EN 12662
Estabilidade à oxidação, 110 °C	horas	8,0	-	EN 14112 EN 15751
Índice de acidez	mgKOH/g	-	0,50	EN 14104
Índice de iodo	g iodo/100g	-	120	EN 14111 EN 16300
Éster metílico do ácido linolénico	% (m/m)		12,0	EN 14103
Ésteres metílicos polinsaturados (≥ 4 duplas ligações)	% (m/m)	-	1,0	EN 15779
Teor em metanol		-	0,20	EN 14110
Teor em monoglicéridos	% (m/m)	-	0,70	EN 14105
Teor em diglicéridos	% (m/m)	-	0,20	
Teor em triglicéridos	% (m/m)	-	0,20	
Glicerol livre	% (m/m)	-	0,02	EN 14105 EN 14106
Glicerol total	% (m/m)	-	0,25	EN 14105
Metais do Grupo I (Na + K)	mg/kg	-	5,0	EN 14108 EN 14109 EN 14538
Metais do Grupo II (Ca + Mg)	mg/kg	-	5,0	EN 14538
Teor em fósforo	mg/kg	-	4,0	EN 14107 EN 16294

2.3. Produção de etanol por fermentação

O bioetanol é produzido recorrendo ao processo de fermentação alcoólica de matérias-primas com quantidades consideráveis de açúcares monoméricos fermentescíveis (sacarose, glucose e/ou frutose) ou que possuam componentes que possam ser convertidos nestes açúcares simples, como o amido, a celulose e a hemicelulose. O processo consiste na metabolização dos açúcares monoméricos por ação de microrganismos (leveduras, bactérias ou fungos), resultando na produção de etanol e dióxido de carbono (CO₂), em condições anaeróbias.

2.3.1. Fermentação de substratos contendo açúcares

Na fermentação alcoólica para produção de etanol por ação de leveduras, a glucose é convertida em etanol. De acordo com a reação química geral da fermentação, 100 kg de glucose produziram 51,1 kg de etanol e 48,8 kg de CO₂ (**Tabela 2.5**).

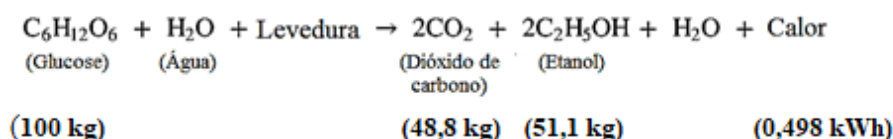


Figura 2.5- Reação química geral da fermentação alcoólica (adaptado de: Zabed, *et al.*, 2017).

Contudo, durante a fermentação, apenas cerca de 95% dos açúcares solúveis são convertidos em etanol e CO₂, pois 1% é convertido em matéria celular e 4% é convertido em outros subprodutos solúveis, tais como glicerol (Zabed *et al.*, 2017).

Neste processo microbiológico, encontram-se envolvidas duas etapas metabólicas. Primeiramente ocorre o processo de glicólise, no qual a glucose é transformada em duas moléculas de ácido pirúvico e, seguidamente, ocorre a fermentação alcoólica propriamente dita, na qual cada molécula de piruvato é transformada numa molécula de etanol e uma molécula de dióxido de carbono (**Figura 2.6**).

O bioetanol obtido é então removido do meio de fermentação contendo outras impurezas, por destilação, processo que permite atingir um grau de pureza de 95%. No entanto, para obter bioetanol anidro, para ser usado como biocombustível, é ainda necessário um passo suplementar de desidratação (Adnan *et al.*, 2014; Sarris e Papanikolaou, 2016; Zabed *et al.*, 2017).

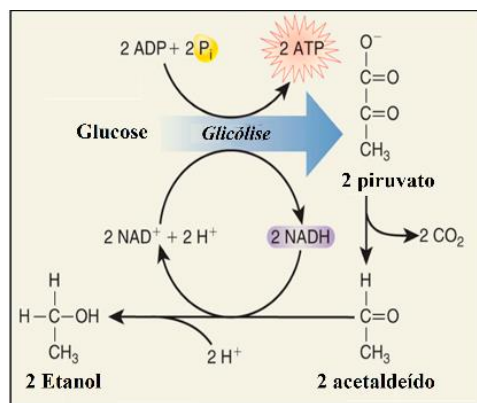


Figura 2.6- Etapas metabólicas (glicólise e fermentação) envolvidas na produção de etanol (ADP- difosfato de adenosina, P_i- radical difosfato, ATP- trifosfato de adenosina, NAD- dinucleótido de nicotinamida e adenina) (adaptado de: El-Dalatony *et al.*, 2017).

Existem vários fatores que influenciam a produção de bioetanol, incluindo temperatura, concentração de açúcar, pH, tempo de fermentação, velocidade de agitação e concentração do inóculo. A taxa de crescimento dos microrganismos é diretamente afetada, por exemplo, pela temperatura, pelo que uma elevada temperatura é desfavorável para o crescimento de células tornando-se um fator de stresse para o microrganismo (Mohd Azhar *et al.*, 2017; Zabed *et al.*, 2017).

Para além de açúcares, é também possível produzir etanol por conversão de outros tipos de fontes de carbono. Existe por exemplo uma grande variedade de leveduras e bactérias que podem realizar a conversão da glicerina, tendo sido já identificadas várias estirpes selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* que são capazes de crescer em glicerina, mesmo sem a adição de quaisquer suplementos de suporte de crescimento, tais como aminoácidos e bases nucleicas. No entanto, o desafio da utilização de glicerina como substrato para *S. cerevisiae* advém do facto da maior parte das estirpes industriais não crescerem de todo em meio de glicerina sintética (Klein *et al.*, 2016).

2.3.2. Processo integrado de fermentação

O bioetanol é produzido diretamente por fermentação a partir de açúcares simples. Contudo, para utilizar biomassa rica em açúcares poliméricos é necessário, antes da fermentação, efetuar um processo de hidrólise, de forma a converter os polissacáridos em monossacáridos.

Com vista à redução das etapas do processo global para diminuir os custos de capital e operacionais, bem como o tempo de processo, têm sido desenvolvidos processos integrados dos quais os 3 que são comumente usados em produção de bioetanol são *separated hydrolysis and fermentation* (SHF), *simultaneous saccharification and fermentation* (SSF) e *simultaneous saccharification and co-fermentation* (SSCF).

Tipicamente, a hidrólise enzimática e a fermentação de açúcares complexos, nomeadamente substratos lenhocelulósicos, são realizadas separadamente, ou seja, aplicando o processo SHF em que o fluxo líquido dos reatores de hidrólise da hemicelulose e da celulose entra no primeiro reator de fermentação para hexoses (glucose). Concluída a fermentação, o caldo do reator é destilado para recuperar o bioetanol, ficando a xilose e outras pentoses não convertidas no caldo. A fermentação das pentoses é então efetuada num segundo reator, seguida de uma destilação suplementar do caldo fermentado. O

processo *separated hydrolysis and co-fermentation* (SHCF) surge quando, após hidrólise, as pentoses e hexoses são fermentadas simultaneamente no mesmo reator.

No entanto, quando a hidrólise é efetuada separadamente da fermentação, a ação enzimática pode ser inibida pela acumulação de açúcares na solução à medida que a hidrólise progride, resultando em baixos rendimentos de açúcares. Além disso, uma maior concentração de açúcares no hidrolisado pode causar stresse osmótico nas células de levedura e, como consequência, reduzir a produtividade do etanol. Em comparação, o processo SSF, sacarificação e fermentação simultâneas, pode evitar o stresse osmótico nas células, a inibição da enzima e a contaminação microbiana durante a fermentação (Mohd Azhar *et al.*, 2017; Zabed *et al.*, 2017). Quando o processo SSF inclui a co-fermentação de hexoses e pentoses, é chamado *simultaneous saccharification and co-fermentation* (SSCF).

O *consolidated bioprocessing* (CBP) é outra integração de processos que envolve não só a hidrólise e a fermentação de todos os tipos de açúcares solúveis, mas também a produção microbiológica de enzimas hidrolíticas, tudo em um único passo (Mohd Azhar *et al.*, 2017; Zabed *et al.*, 2017).

2.3.3. Matérias-primas

2.3.3.1. Composição

As matérias-primas utilizadas na produção de bioetanol podem ser classificadas em três categorias: matérias-primas ricas em sacarose (ex: cana-de-açúcar, beterraba, sorgo, polpa de alfarroba), em amido (ex: milho, trigo e cevada) e, por fim, biomassa lenhocelulósica (ex: madeira, palha e ervas) em que a celulose e a hemicelulose são as principais fontes de açúcares. Assim, o processo de produção de etanol varia consideravelmente dependendo da natureza da matéria-prima e, principalmente, devido às variações na sua composição química, que dependem da localização geográfica, condições climáticas, características e condições locais do solo e práticas agrícolas (Chang *et al.*, 2017; Haq *et al.*, 2016; Zabed *et al.*, 2017).

A biomassa rica em sacarose é composta por unidades de glucose e frutose (Zabed *et al.*, 2017). Já a biomassa rica em amido é composta por dois polímeros de unidades de α -D-glucose, a amilose e a amilopectina. A amilose (com ligações glicosídicas α -1 \rightarrow 4) é um polímero linear de cerca de 1000 unidades de glucose, enquanto a amilopectina (com ligações α -1 \rightarrow 4 e α -1 \rightarrow 6) possui uma configuração altamente ramificada, com um ramo que se liga por ligações α -1 \rightarrow 6 a cada 20 ligações.

As propriedades físico-químicas do amido estão frequentemente associadas à razão amilose: amilopectina, o que pode afetar significativamente o rendimento final em etanol. Como as leveduras não são capazes de hidrolisar este polissacárido, é sempre necessário um pré-tratamento para hidrólise do amido.

A biomassa lenhocelulósica é composta por celulose (40-55%), hemicelulose (25-50%) e lenhina (10-40%). Em contraste com a celulose, que é composta de glucose, a hemicelulose é composta por açúcares de seis e cinco carbonos (por exemplo, xilose). Assim, o pré-tratamento e a hidrólise de materiais lenhocelulósicos geram uma mistura de hexoses e de pentoses (Wei *et al.*, 2015).

Comparando com a fermentação do hidrolisado de amido que contém apenas glucose, o hidrolisado de biomassa lenhocelulósica contém uma mistura de açúcares. Os açúcares de 6 carbonos, como a glucose,

a galactose e a manose, são facilmente fermentados por muitos microrganismos que ocorrem naturalmente, tradicionalmente do tipo *Saccharomyces cerevisiae* (Zabed *et al.*, 2017).

2.3.3.2. Pré-tratamentos

Para facilitar a ação dos microrganismos é necessário a obtenção de uma solução que contenha açúcares fermentescíveis, efetuando pré-tratamentos (Mohd Azhar *et al.*, 2017).

As etapas do processo de pré-tratamento de matérias-primas simples, como a biomassa rica em sacarose, incluem basicamente pressão mecânica da biomassa e fracionamento com separação do componente sólido, obtendo-se um extrato com hexoses fermentescíveis (Chang *et al.*, 2017).

Quanto às biomassas mais complexas, para realizar a conversão de amido em etanol é necessário efetuar dois passos principais, hidrólise e fermentação, enquanto a biomassa lenhocelulósica requer pré-tratamentos mais drásticos antes de se poderem realizar os passos mencionados (Chang *et al.*, 2017; Zabed *et al.*, 2017b).

Quando se usam matérias-primas mais complexas como os materiais lenhocelulósicos, os métodos mais utilizados para desconstruir a biomassa, solubilizando a celulose e a hemicelulose e separando-as da lenhina, incluem processos: físicos (moagem mecânica), químicos (ozonólise, hidrólise ácida, hidrólise alcalina e utilização de solventes orgânicos), biológicos (envolvimento de diferentes espécies de fungos) e físico-químicos (inclui explosão de fibra de amónia ou de vapor). O método de pré-tratamento mais utilizado é a explosão de vapor, devido ao menor impacto ambiental, baixo investimento de capital, alta eficiência energética, menor utilização de produtos químicos, condições de processo menos perigosas e maior rendimento de recuperação de açúcar. Posteriormente, o processo de hidrólise permite converter os açúcares poliméricos (amido, celulose e hemicelulose) em açúcares fermentescíveis, para a produção de bioetanol. Em geral, a hidrólise pode ser feita por métodos ácidos ou enzimáticos, e o seu resultado é geralmente dependente do tipo e composição da biomassa e das condições da hidrólise.

A hidrólise ácida encontra-se dividida em dois tipos, diluída e concentrada. A hidrólise ácida diluída é realizada a uma temperatura mais elevada e baixa concentração de ácido, enquanto a hidrólise ácida concentrada é realizada a uma temperatura mais baixa usando alta concentração de ácido. Dos dois tipos de hidrólise, a hidrólise ácida diluída é o processo mais utilizado, no entanto, gera uma grande quantidade de inibidores em comparação com a hidrólise ácida concentrada, enquanto o processo ácido concentrado gera maior recuperação de açúcar (90%) num menor período de tempo. As desvantagens da hidrólise ácida são a dificuldade de realizar um processo de recuperação e reciclagem de ácido, o que aumenta o custo de produção (Zabed *et al.*, 2017).

A hidrólise enzimática é um passo de conversão bioquímica que recorre a enzimas para converter polímeros, tais como o amido, em glucose e para quebrar a celulose e a hemicelulose em açúcares monoméricos, constituintes dos seus polímeros de base, incluindo glucose e xilose (Chang *et al.*, 2017). A eficiência da hidrólise enzimática é influenciada por condições tais como temperatura, tempo, pH, carga enzimática e concentração do substrato. A quantidade de açúcar fermentescível libertada aumenta à medida que a carga enzimática aumenta ou enquanto a carga de celulose diminui. (Zabed *et al.*, 2017).

Dos dois métodos de hidrólise mencionados, a hidrólise enzimática é o método de sacarificação mais utilizado devido à obtenção de maiores rendimentos, maior seletividade, menor custo de energia e condições de operação mais suaves que os processos químicos.

2.3.3.3. Distribuição de matérias-primas

Na produção de bioetanol, a biomassa rica em sacarose (cana-de-açúcar, beterraba sacarina) e a biomassa rica em amido (milho, trigo) são as matérias-primas mais utilizadas (**Tabela 2.6**).

O bioetanol é produzido por vários países, dos quais se podem destacar os EUA, Brasil, China, Canadá, França, Alemanha e Tailândia. Este conjunto de países concentra cerca de 96% da produção mundial (Barometer, 2016) utilizando como matérias-primas: o milho (EUA, China e Canadá), o trigo (EUA, Alemanha, França), a cana-de-açúcar (Brasil) e a beterraba sacarina (UE) (ENMC, 2017).

Tabela 2.6- Origem das matérias-primas utilizadas na UE para produção de bioetanol (kton) em 2012 (adaptado de: ENMC, 2017).

País	Matérias-primas								Total
	Trigo	Milho	Cevada	Centeio	Triticale	Beterraba	Vinho	Cana-de-açúcar	
<i>UE*</i>	829	703	25	57	10	580	8	-	2.243 (78,65%)
<i>EUA</i>	3	274	-	-	-	-	-	-	277
<i>Ucrânia</i>	5	58	-	-	-	-	-	-	64
<i>Guatemala</i>	-	-	-	-	-	-	-	42	42
<i>Argentina</i>	-	7	-	-	-	-	-	19	26
<i>Rússia</i>	16	8	-	-	-	-	-	-	24
<i>Perú</i>	-	-	-	-	-	-	-	23	23
<i>Paquistão</i>	-	-	-	-	-	-	-	21	21
<i>Brasil</i>	1	4	-	-	-	-	-	12	17
<i>Sudão</i>	-	-	-	-	-	-	-	11	11
<i>Sérvia</i>	-	10	-	-	-	-	-	-	10
<i>Outros</i>	8	3	-	-	-	5	-	10	92
Total	861	1.067	25	57	19	585	8	138	2.852

Em Portugal, ainda não existe produção de bioetanol, pelo que este é obtido por importação de outros países como o Brasil, principalmente (ENMC, 2017).

Tal como acontece com o biodiesel, devido aos limites impostos na utilização de culturas alimentares para a sua produção, a expansão do bioetanol de 1ª Geração (Secção 2.1) está limitada, pelo que a utilização de biomassa lenhocelulósica, e preferencialmente a residual, é o maior potencial.

2.3.4. Propriedades/Qualidade do bioetanol

O controlo de qualidade assume extrema importância, na definição dos parâmetros para a segurança, desempenho e integridade do motor, veículo e infraestruturas de suporte. De forma a garantir-se a qualidade do bioetanol, este terá de cumprir determinadas especificações. Na Europa e, consequentemente em Portugal, a norma EN 15376:2014, estabelece os limites para os vários parâmetros físicos e químicos para o bioetanol como componente de incorporação em gasolina (**Tabela 2.7**).

Tabela 2.7- Requisitos aplicáveis e métodos de ensaio para o bioetanol definidos na EN 15376:2014.

Parâmetro	Unidade	Limites legais		Métodos
		Mínimo	Máximo	
Etanol (incl. álcoois altamente saturados)	% (m/m)	98,7		EN 15721
Monoálcoois altamente saturados (C3-C5)	% (m/m)		2,0	EN 15721
Metanol	% (m/m)		1,0	EN 15721
Água	% (m/m)		0,3	EN 15489
Acidez total (como ác. acético)	% (m/m)		0,007	EN 15491
Condutividade elétrica	µS/ cm		1,5	EN 15938
Aparência	-	Límpido e transparente	Inspeção visual	EN 15769
Cloreto inorgânico	mg/kg		1,5	EN 15492
Sulfato	mg/kg		3,0	EN 15492
Cobre	mg/kg		0,100	EN 15488
Fósforo	mg/L		0,15	EN 15837
Matéria não volátil	mg/100mL		10,0	EN 15487
Enxofre	mg/kg		10,0	EN 15491
				EN 15485
				EN 15486
				EN 15837

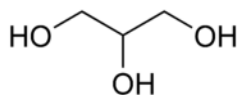
2.4. Glicerina

A glicerina, também denominada de glicerol, foi descoberta, pela primeira vez, por C.W. Scheele em 1779 ao realizar a saponificação de azeite com óxido de chumbo. No ano de 1857, Pasteur demonstrou que a glicerina, em conjunto com o ácido succínico, podia ser produzida a partir de açúcares através de uma via bioquímica, denominada fermentação alcoólica. Até a década de 1930, a glicerina era produzida principalmente através de um processo de separação de gordura. No entanto, a partir de 1943 começou a ser produzida sinteticamente, mas o seu uso tem perdido popularidade sobre a glicerina derivada de fontes renováveis devido à sua produção ser economicamente ineficaz (Kong *et al.*, 2016).

Atualmente, a glicerina pode ser obtida a partir de triglicéridos, como coproduto de quatro processos diferentes: transesterificação (produção de biodiesel), saponificação (produção de sabão), hidrólise para produção de ácidos gordos e fermentação microbiana (Dhabhai *et al.*, 2016).

2.4.1. Caracterização físico-química

A glicerina ou glicerol ($C_3H_8O_3$) é o composto orgânico com o nome sistemático (IUPAC) 1,2,3-propanotriol. É constituída por uma cadeia de três átomos de carbono com um grupo hidroxilo (-OH) ligado a cada um dos átomos de carbono (**Figura 2.7**). Estes grupos hidroxilo são responsáveis pela sua higroscopicidade e solubilidade em água. A extensa ligação intermolecular de hidrogénio é responsável pela elevada viscosidade e ponto de ebulição (**Tabela 2.8**).

**Figura 2.7-** Estrutura da glicerina (adaptado de: Kong *et al.*, 2016).

Tal como outros álcoois, o glicerol tem uma pressão de vapor mais baixa do que seria esperado pelo seu peso molecular. A baixa pressão de vapor é uma característica dos álcoois, água e outros compostos polares e é o resultado da associação molecular (Quispe *et al.*, 2013).

Tabela 2.8- Propriedades químicas e físicas da glicerina (adaptado de: Quispe *et al.*, 2013).

Propriedades	Unidade de Medida	Valor
Massa molar	g/mol	92
Massa volúmica	kg/m ³	1260
Viscosidade	Pa s	1,41
Ponto de fusão	°C	18
Ponto de ebulição	°C	290
Ponto de inflamação	°C	160
Ponto de ignição	°C	393
Tensão superficial	mN/m	63,4
Pressão de vapor	mmHg	1

A glicerina é completamente solúvel em água, ligeiramente solúvel em éteres e dioxanos, e parcialmente insolúvel em álcoois superiores, ácidos gordos e hidrocarbonetos, bem como em solventes clorados como o clorofórmio. É também um bom solvente para muitas substâncias, tais como iodo, bromo e fenol, devido à presença dos grupos hidroxilo (Quispe *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2013). É uma molécula reativa devido à presença de grupos álcool primários e secundários que podem ser substituídos por outros grupos químicos, podendo sofrer reações para formar derivados tais como éteres, ésteres, aminas e aldeídos. Fisicamente, a glicerina pura apresenta-se como uma substância líquida incolor, inodora e viscosa (Tan *et al.*, 2013).

2.4.2. Produção Mundial

Desde 1999, a produção da glicerina proveniente da produção de biodiesel passou a ter o papel principal no fornecimento mundial desta matéria-prima, ultrapassando as indústrias de oleoquímica (Ciriminna *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2013).

A produção da glicerina é efetuada, maioritariamente, através da reação de transesterificação (Secção 2.2.2) por catálise básica homogénea seguida de separação gravitacional de fases entre biodiesel e glicerina. Assim, a fase residual que se obtém é constituída por uma mistura de glicerol e algumas impurezas, tais como água, álcoois, ésteres, sais e sabões (Tan *et al.*, 2013). Por conter impurezas, a glicerina resultante dessa fonte é designada por glicerina bruta/não refinada (Dhabhai *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, o crescimento e desenvolvimento da indústria de biodiesel tem conduzido a uma produção excedentária da glicerina não refinada, uma vez que a produção desta corresponde a cerca de 10% da produção de biodiesel, isto é, por cada 10 kg de biodiesel produzido obtém-se aproximadamente 1 kg de glicerina (**Tabela 2.2**) (Anuar e Abdullah, 2016; Quispe *et al.*, 2013). Tem-se registado, portanto, ao longo dos anos, um aumento da produção mundial da glicerina bruta (**Figura 2.8**) que se prevê que atinja 41,9 milhares de milhões de litros em 2020 (Nanda *et al.*, 2014).

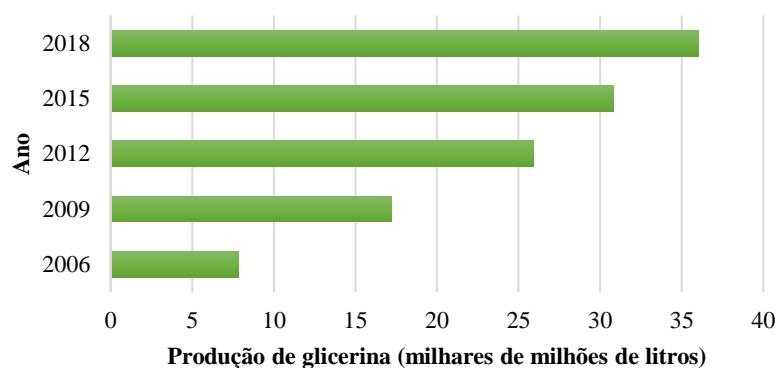


Figura 2.8- Cenário mundial da produção de glicerina bruta por transesterificação desde 2006 (adaptado de: Nanda *et al.*, 2014).

Presentemente, os principais setores industriais com maior utilização da glicerina em todo o mundo são o da cosmética, o dos sabões e o dos produtos farmacêuticos (**Figura 2.9**), porém, estes exigem uma glicerina com um elevado grau de pureza (99,5% - 99,7%) (Ardi *et al.*, 2015; Ciriminna *et al.*, 2014).



Figura 2.9- Distribuição do consumo de glicerol em diferentes produtos e indústrias (adaptado de: Ardi *et al.*, 2015).

2.4.3. Produção de glicerina por transesterificação de óleos e gorduras

A composição da glicerina bruta resultante do processo de produção de biodiesel depende principalmente de dois fatores-chave: matéria-prima utilizada (pureza e constituição; (Secção 2.2.3)) e processo de produção de biodiesel (tipo e quantidade de catalisador; (Secções 2.2.1 e 2.2.2)) (Zhang e Wu, 2015; Wan *et al.*, 2015). A composição da glicerina bruta obtida da produção de biodiesel é bastante diversa e apresenta geralmente um teor em glicerol de 80 a 85% m/m, com algumas impurezas,

(Sivasankaran *et al.*, 2016). Através da caracterização da glicerina bruta é possível identificar a proveniência e a quantidade das impurezas presentes (**Tabela 2.9**). De forma a aumentar o grau de pureza da glicerina não refinada torna-se necessário recorrer a processos de refinação efetuando alguns tratamentos (Secção 2.4.4) que permitam remover os constituintes indesejáveis que, por sua vez, poderão ser valorizados noutras aplicações (Luo *et al.*, 2016; Ardi *et al.*, 2015).

Tabela 2.9- Associação entre as características da glicerina não refinada e o processo de produção de biodiesel (Ardi *et al.*, 2015; Dhabhai *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2016; Marx, 2016; Muniru *et al.*, 2016; Pal e Chaurasia, 2016; Rodrigues *et al.*, 2016).

Origem	
Teor em glicerol	Tipo e pureza da matéria-prima usada na transesterificação
Teor em sabões	Reação de saponificação entre os ácidos gordos livres presentes na matéria-prima e o catalisador básico utilizado na transesterificação
Teor em cinzas	Catalisador utilizado no processo de transesterificação.
Teor em água	Quantidade de água presente na matéria-prima e/ou nos reagentes utilizados na transesterificação
Teor em metanol	Excesso de metanol usado para garantir alta produtividade de biodiesel
Teor em MONG	Subprodutos da transesterificação (mono-, di- e triglicéridos) bem como AGL
pH	Tipo de catálise usado na transesterificação
Cor	Tipo e pureza da matéria-prima usada na transesterificação

2.4.4. Pré-tratamento/Purificação da glicerina bruta

Com vista a aumentar o grau de pureza da glicerina não refinada, isto é o teor em glicerol, é necessário efetuar alguns tratamentos que permitam remover os constituintes indesejáveis (Ardi *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2016). Para remover e recuperar o álcool não utilizado durante o processo de transesterificação, recorre-se ao processo de destilação, obtendo-se um produto que pode ser posteriormente reintroduzido no processo de produção (Luo *et al.*, 2016).

Após recuperação do metanol pode aplicar-se um processo de acidificação, que é o método mais comum de pré-tratamento, que permite remover ácidos gordos livres/sabões (Ardi *et al.*, 2015).

Quando ocorre transesterificação básica de matérias-primas oleaginosas, a glicerina não refinada resultante desse processo contém, muitas vezes, um significativo teor de sabões que podem ser convertidos a AGL por acidificação com um ácido forte (ex. ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido nítrico (HNO_3) ou ácido clorídrico (HCl)). Este procedimento permite diminuir o valor de pH da glicerina não refinada e, simultaneamente, promover a precipitação de sal formado pelo anião do ácido e o catião da base presente nos sabões, com consequente libertação dos AGL, resultando na formação de três fases.

Os ácidos gordos livres e alguns ésteres residuais encontram-se localizados na fase superior e podem ser facilmente removidos por decantação ou centrifugação, o glicerol e a água encontram-se na fase intermédia, e os sais insolúveis na fase sólida inferior (Dhabhai *et al.*, 2016).

Os AGL recuperados da glicerina por decantação podem ainda ser reaproveitados e transformados em biodiesel, realizando uma esterificação ácida com ácido sulfúrico (H_2SO_4) ou ácido clorídrico (HCl) em presença de um álcool, usualmente metanol (Secção 2.2.1) (Anderson *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2013).

Da fase da glicerina remanescente é ainda possível proceder à evaporação da água presente, obtendo-se uma glicerina semi-refinada com um teor em glicerol mais elevado.

No entanto, para obtenção de glicerina com elevada pureza têm de ser realizados passos adicionais, tais como destilação sob pressão reduzida, desodorização e branqueamento (com carvões ativados ou adsorção em resinas de permuta iónica), que são processos muito dispendiosos (Skrzyńska *et al.*, 2014)

2.4.5. Valorização da glicerina

Como referido anteriormente (Secção 2.2), com o aumento da produção de biodiesel, as grandes quantidades de glicerina também produzidas têm impacto no mercado, resultando na diminuição dos preços deste subproduto bruto e refinado, bem como no surgimento da problemática do seu destino final. Assim, ao excedente da glicerina não refinada poderá dar-se como destino final a eliminação ou procurar novos métodos de valorização (Chen e Liu, 2016; Luo *et al.*, 2016).

No que diz respeito à eliminação, o método atual é a incineração, no qual a glicerina não refinada é utilizada para produzir energia. No entanto, a queima da glicerina como combustível, a alta temperatura (280-300°C), causa a sua polimerização e a sua oxidação parcial em acroleína, um composto tóxico usado como biocida (Anuar e Abdullah, 2016; Kong *et al.*, 2016).

A via tradicional de valorização da glicerina não refinada consiste em obter, através de processos de refinação, glicerina pura, uma matéria-prima útil para as indústrias tradicionais alimentares, farmacêuticas, de cosméticos, de tabaco e de têxteis. No entanto, para estas indústrias, a pureza terá de ser superior a 99,5% o que, devido à presença de impurezas, torna o processo mais complexo e o custo de refinação elevado. Por isso, a purificação de glicerina bruta não é economicamente favorável para os setores que trabalham com produtos de menor valor acrescentado (Luo *et al.*, 2016; Schultz *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2013)

Com vista a colmatar o declínio na procura e o aumento na oferta desta matéria-prima poderá optar-se pela conversão da glicerina não refinada em outros produtos de valor acrescentado, através de vias de conversão biológicas ou químicas com várias aplicações práticas no setor emergente da energia renovável (He *et al.*, 2017).

Com efeito, a integração desta matéria-prima residual nos processos de produção de energia renovável pode ser uma alternativa promissora para a sua valorização, uma vez que, não só beneficia os processos, como também permite melhorar a sustentabilidade económica da indústria de biodiesel e reduzir os impactos ambientais da eliminação deste resíduo (Luo *et al.*, 2016).

A adição de glicerina bruta a biomassa melhora, por exemplo, o rendimento de obtenção de biogás, bio-óleo, hidrogénio e álcoois em processos de codigestão, cogaseificação, copirólise, coliquefação e refinação a vapor (He *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2016).

Uma via promissora para valorizar o excesso de glicerina não refinada poderá ser também a sua utilização como substrato em bioprocessos industriais com o fim de obter diretamente compostos com valor energético, como o bioetanol (Secção 2.3), ou precursores que possam ser usados como matéria-prima em processos de produção de energia, como os lípidos a partir dos quais se produz o biodiesel (Secção 2.2) (Klein *et al.*, 2016).

Estudos realizados, têm mostrado que a utilização do glicerol oferece uma excelente oportunidade de obter produtos químicos por fermentação microbiana, representando uma alternativa para acrescentar valor à cadeia de produção de biodiesel, ajudando ao desenvolvimento de biorrefinarias, o que permitirá que este biocombustível seja mais competitivo (Almeida *et al.*, 2012).

O glicerol pode ser convertido por duas vias, biológica e química, em vários produtos de valor acrescentado, tais como álcoois, ácidos orgânicos, aminoácidos, combustíveis, etc. Biologicamente, o glicerol pode ser convertido em produtos tais como, 1,2-propanodiol, n-butanol, 2,3-butanodiol, etanol, hidrogénio, metano, ácidos gordos polinsaturados, lípidos, poli-hidroxialcanoatos (PHAs), aminoácidos (**Figura 2.10**), utilizando diferentes tipos de microrganismos (por exemplo, bactérias, fungos e microalgas) com capacidade metabólica para o seu processamento. As conversões podem ser conduzidas em condições anaeróbias ou aeróbias, dependendo do produto requerido (Luo *et al.*, 2016).

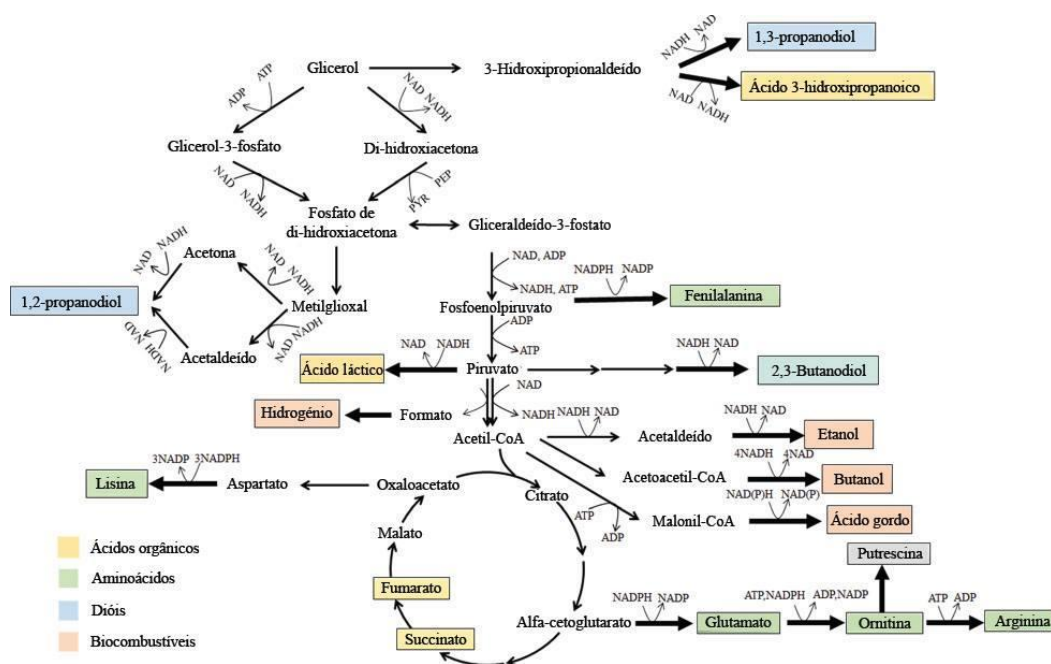


Figura 2.10- Vias metabólicas de conversão do glicerol para produção de vários compostos (adaptado de: Chen e Liu, 2016).

Por via química, a partir do glicerol pode produzir-se, por exemplo, acroleína, monoglicéridos e seus derivados, poliglicerol, polióis, poliuretanos, solketal, ácido láctico e bio-óleo, utilizando catalisadores. As impurezas no glicerol bruto podem afetar o processo de conversão de valor agregado e podem participar de reações como reagente ou catalisador para a produção de produtos químicos e polímeros, dependendo do mecanismo de reação (Luo *et al.*, 2016).

Em comparação com a transformação química, as vias biológicas têm várias vantagens, tais como, maior especificidade, maior tolerância a impurezas, menor consumo de energia (por exemplo, baixa temperatura/pressão).

Também em comparação com outras fontes de carbono (por exemplo, glucose e xilose), o glicerol possui um maior grau de redução e, assim, pode gerar mais equivalentes redutores, conferindo capacidade para produzir combustíveis e produtos químicos reduzidos, com maiores rendimentos. Existem vários microrganismos que podem metabolizar glicerol. No entanto, a utilização direta pelos organismos naturais a nível industrial é muitas vezes limitada pelas baixas taxas de produção, baixos rendimentos e custo elevado (Chen e Liu, 2016).

No ano de 2016, surgiu um estudo de viabilidade da valorização do glicerol num contexto de biorrefinaria, abrangendo alguns dos produtos passíveis de serem produzidos pela conversão do glicerol. Este concluiu que as melhores opções são através da produção de ácido láctico, ácido succínico ou 1,2-propanodiol sugerindo, como estratégia de redução de risco, a criação de uma biorrefinaria diversificada capaz de alternar entre a produção de ácido láctico e ácido succínico.

Em suma, a transformação da indústria convencional de biodiesel numa biorrefinaria integrada não só irá aumentar a sua viabilidade económica, como também proporcionar uma plataforma de substituição potencial para produtos à base de energia fóssil, instigando uma provável melhoria geral do desempenho ambiental (Gargalo *et al.*, 2016).

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

Neste capítulo encontram-se descritas todas as técnicas, materiais e procedimentos utilizados na presente dissertação, englobando a caracterização físico-química e pré-tratamento de glicerina não refinada proveniente de um processo de produção de biodiesel, e a produção de lípidos e bioetanol a partir da glicerina pré-tratada.

3.1. Materiais

3.1.1. Glicerina não refinada

Neste trabalho foram utilizados três lotes de glicerina não refinada provenientes de diferentes processos de produção de biodiesel (**Figura 3.1**) e que foram gentilmente cedidos pelas empresas Bio-Oeste e Iberol (**Tabela 3.1**).

Tabela 3.1- Amostras de glicerina não refinada utilizadas neste trabalho.

Glicerina	Empresa
A	Bio Oeste, Lda
B	Iberol, SA
C	Iberol, SA

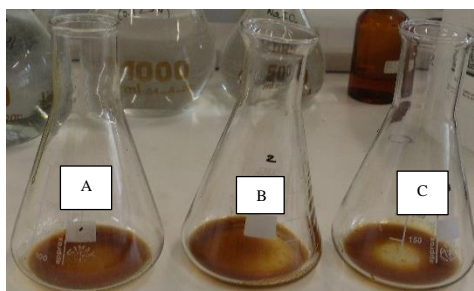


Figura 3.1- Amostras de glicerina não refinada utilizadas neste trabalho.

3.1.2. Microrganismos

De forma a utilizar a glicerina não refinada, previamente tratada, como fonte de carbono e sais, para a produção de etanol e de biomassa rica em óleo, foram utilizadas várias leveduras (**Tabela 3.2**).

Tabela 3.2- Microrganismos usados para produção de etanol e de biomassa oleaginosa

Produção de etanol	Produção de biomassa oleaginosa
<i>Saccharomyces bayanus</i> ATCC 66263	
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> ATCC 6269	<i>Rhodospiridium toruloides</i> NCYC 921
<i>Saccharomyces cerevisiae I-uvarum</i> CCMMI 885	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> IGC 5058
<i>Pichia stipitis</i> CBS 181.F	

As leveduras foram mantidas a 4 °C em rampas de meio de repicagem com a composição referida na **Tabela 3.3**. As rampas foram previamente esterilizadas em autoclave durante 15 min à temperatura de 121 °C e a uma pressão de 1,2 bar, inoculadas em condições de assepsia e incubadas a 30 °C durante 2 dias.

Tabela 3.3- Composição do meio de repicagem para leveduras.

Reagentes	Concentração (g/L)
Agar	20
Glucose	10
Peptona	5
Extrato de levedura	3
Extrato de malte	3

3.1.3. Meios de cultura

Para inocular os meios de fermentação, usaram-se leveduras recolhidas em fase de crescimento exponencial de um pré-inóculo preparado com glucose como fonte de carbono (50 g/L) e os reagentes descritos na **Tabela 3.4**.

Tabela 3.4- Composição base do meio de cultura (MC)

Reagentes	Concentração (g/L)
Extrato de levedura	5
Sulfato de amónio	5
Dihidrogenofosfato de potássio	5
Sulfato de magnésio heptahidratado	1

Para os ensaios de fermentação usou-se o mesmo meio utilizando, como fonte de carbono, glicerina comercial purificada (87%) ou glicerina não refinada pré-tratada a pH=5 com HCl numa concentração de 7,5 g/L.

Em todos os casos os meios foram esterilizados em autoclave durante 15 min em porções separadas de fonte carbono e sais, para evitar que ocorresse reação de *Maillard* (acastanhamento) em presença de glucose ou polimerização em presença de glicerol, que posteriormente se juntaram sob assepsia.

3.1.4. Reagentes e equipamentos

As listas de reagentes e equipamentos utilizados neste trabalho encontram-se nos Anexos I e II, respetivamente.

3.2. Caracterização da glicerina não refinada

A glicerina não refinada que é um subproduto resultante da produção de biodiesel pelo processo de transesterificação, que depende da tecnologia imposta bem como da pureza da matéria-prima utilizada como material de partida, pode conter numerosos tipos de impurezas, tais como álcoois, ésteres de ácidos gordos, sais, água e sabões.

A glicerina não refinada foi, portanto, caracterizada tendo em conta os teores de:

- i. Glicerol (norma Ea 6-51, AOCS) – O método consiste na oxidação do glicerol por periodato de sódio em meio ácido, formando aldeídos e ácido fórmico. Este último é uma medida do teor de glicerol da amostra, sendo doseado por titulometria ácido-base após destruição do excesso de periodato com etilenoglicol.
- ii. Sabões (método de Rieman adaptado (*Manuel d'Analyse des Corps Gras*, 1968)) – O método consiste na neutralização dos sabões por titulação com ácido clorídrico, após neutralização do excesso de catalisador básico se este se encontrar presente, entendendo-se por teor em sabões, a quantidade de sabões, expressa em grama de oleato de potássio por grama.
- iii. Água (norma EN ISO 12937:2000) – O método baseia-se na reação de Karl Fischer, consistindo na injeção da amostra no recipiente de titulação de um aparelho de Karl Fischer coulométrico. Neste, o iodo necessário à reação é gerado coulometricamente no ânodo. Após titulação de toda a água presente na amostra, a libertação de iodo em excesso é detetada por um detetor eletrométrico, terminando a titulação. De acordo com a estequiometria da reação, 1 mole de iodo reage com 1 mole de água sendo, portanto, a quantidade de água na amostra, pela lei de Faraday, proporcional à corrente total integrada.
- iv. Cinzas (norma NF T 60-364:1980) – O teor de cinzas é a quantidade de cinzas isentas de carbono presentes na amostra, e doseia-se por gravimetria após calcinação a 550°C.
- v. Metanol (método interno LBB/LNEG) – O teor em metanol em cada amostra de glicerina foi determinado diretamente por cromatografia em fase gasosa, analisando a amostra adequadamente diluída e misturada com igual quantidade de solução de padrão interno (2-

propanol). A análise foi realizada num cromatógrafo equipado com detetor de ionização por chama, injetor *on-column* e uma coluna com 2 m de comprimento, 1/8" de diâmetro e enchimento de 4% Carbowax 20M, 1% ácido trimesílico e 80-120 Carbopack BDA. As temperaturas utilizadas no injetor, detetor e forno foram, respetivamente, 150, 200 e 110°C e o gás de arrastamento utilizado foi o hélio.

- vi. MONG (matéria orgânica não glicerol) (norma NF T 60-368:1980) - Entende-se por teor em MONG de uma amostra de glicerina, o valor da diferença obtida subtraindo a 100 os valores dos teores em glicerol, água e cinzas da amostra, expressos em percentagem de peso.
- vii. Ácidos gordos (normas ISO 12966-2:2011 e ISO 12966-4:2015) – A determinação qualitativa e quantitativa da composição em ácidos gordos, realizou-se por análise cromatográfica após conversão dos ácidos gordos a ésteres metílicos. Esta determinação inclui a saponificação com hidróxido de sódio em metanol, seguida da transformação dos sabões em ésteres metílicos por reação com um complexo de trifluoreto de boro e metanol. A análise cromatográfica foi realizada preparando a amostra com adição de padrão interno (heptadecanoato de metilo) para injetar num cromatógrafo equipado com amostrador automático, detetor de ionização por chama e coluna capilar (Supelcowax 10, comprimento de 30 m, diâmetro interno de 0,32 mm e espessura de filme de 0,25 µm). A análise foi realizada nas seguintes condições:
 - Temperatura do injetor e detetor – 250 °C;
 - Gás de arrastamento (Hélio (N50); 12 psi);
 - Temperatura inicial da coluna: 60°C (2 min);Taxa de aquecimento:
 - 10 °C/min até 200 °C;
 - 5 °C/min até 230 °C;
 - 8 °C/min até 250 °C;Temperatura final da coluna: 250 °C (6 min)
- viii. Ésteres de ácidos gordos (norma EN ISO 14103:2003) – A determinação quantitativa do teor em ésteres de ácidos gordos numa amostra faz-se por cromatografia gasosa após adição, à amostra, de padrão interno (heptadecanoato de metilo). A análise realiza-se de acordo com o descrito no ponto anterior.

Para além destas determinações realizou-se também a medida do valor de pH nas amostras de glicerina não refinada.

Todas as análises realizadas foram efetuadas em duplicado.

3.3. Pré-tratamento da matéria-prima

A glicerina não refinada foi sujeita a processos de pré-tratamento de modo a separar as diferentes frações que a compunham: ácidos gordos livres (AGL), resíduo contendo glicerol e sais (glicerina pré-tratada).

Os vários passos foram otimizados tendo em conta o respetivo rendimento e uma maior recuperação do glicerol para posterior utilização nos processos de fermentação.

3.3.1. Acidificação da glicerina para separação dos ácidos gordos livres

Com vista a separar os constituintes presentes na glicerina não refinada realizou-se um primeiro processo de acidificação, que consistiu na adição de um ácido mineral forte permitindo diminuir o valor de pH e, simultaneamente, a precipitação de sal formado pelo anião do ácido e o catião dos sabões presentes na amostra de glicerina não refinada, com consequente libertação e separação dos AGL.

A separação final de fases, após cerca de 1 h sob agitação magnética foi, em geral, realizada por centrifugação (10 000 rpm; 25 °C; 10 min), observando-se a formação de várias camadas distintas, isto é, uma camada superior de ácidos gordos livres (orgânica), uma camada intermédia rica em glicerol (aquosa) e, em alguns casos, uma camada inferior sólida de precipitado de sais inorgânicos. Em ambas as camadas líquidas foi realizada uma avaliação do teor em ácidos gordos, por transformação destes em ésteres (secção 3.2 - vii). Na fase aquosa rica em glicerol foi ainda determinada a concentração de glicerol (secção 3.2 - i).

A. Efeito do tipo de ácido

Para este fim, estudou-se o efeito da adição de vários ácidos (ácido fosfórico (H_3PO_4), sulfúrico (H_2SO_4), nítrico (HNO_3) e clorídrico (HCl)), sob agitação magnética forte, a diferentes tomas de 250 g de glicerina não refinada, para um valor de pH final de cerca de 6.

B. Efeito da presença de solvente

Dado que a quantidade recuperada de fase orgânica contendo os ácidos gordos foi sempre muito reduzida, e a fase do glicerol ainda apresentava presença de ésteres, avaliou-se o efeito da adição de um solvente com elevada afinidade para gorduras (hexano) no sentido de melhorar o rendimento de recuperação e aumentar a espessura da camada orgânica facilitando, por conseguinte, a separação.

Repetiu-se então o ensaio de acidificação a pH 6 com HCl e uma toma de amostra de 50 g de glicerina não refinada, adicionando no final um volume de 20 mL de hexano, em ampola de extração. Após separação das fases por decantação, o solvente foi removido da fase orgânica em rotavapor ($P=193$ mbar, $T=40^\circ\text{C}$) e seguidamente em estufa (30 min a 103°C). A quantidade de AGL presentes na amostra foi determinada por pesagem.

C. Efeito do pH

Depois de selecionado o ácido clorídrico para prosseguir o trabalho, estudou-se o efeito do pH na eficiência da separação. Assim, procedeu-se à acidificação de tomas de 250 g de glicerina não refinada ajustando o valor de pH final na gama de 3 a 6.

3.3.2. Caraterização da glicerina não refinada pré-tratada

Otimizado o processo de pré-tratamento da glicerina para separação dos AGL, efetuou-se um ensaio em maior escala a pH 5, ajustado com ácido clorídrico, e utilizando 500 g de matéria-prima. Neste caso, a glicerina pré-tratada foi caracterizada tal como descrito na secção anterior: avaliação do rendimento mássico e do teor em ácidos gordos (secção 3.2 - vii) em ambas as fases e determinação da concentração

de glicerol (secção 3.2 - i) na fase aquosa. Para uma caracterização mais detalhada da glicerina pré-tratada, que iria ser a fonte de carbono dos processos fermentativos, avaliou-se ainda nesta última os teores em água (secção 3.2 - iii), cinzas (secção 3.2 - iv), metanol (secção 3.2 - v) e MONG (secção 3.2 - vi). Além disso, e com vista à sua utilização como matéria-prima para a produção de FAME, a fase orgânica contendo os AGL foi também caracterizada em termos de índice de acidez e teor em metanol:

- i. Metanol (norma EN 14110:2003) – O teor em metanol na fase orgânica foi determinado por cromatografia em fase gasosa após volatilização em *headspace*, sendo a quantidade deste composto expressa em percentagem de peso, permitindo a determinação do teor em metanol. Para o efeito, pesou-se cerca de 4g de amostra e 20 µL de padrão interno (2-propanol), em duplicado, para *vials* diferentes que foram de seguida selados e agitados. A amostra foi aquecida a 80 °C durante 45 min, e 80 µL da fase gasosa foram injetados num cromatógrafo equipado com detetor de ionização por chama, injetor *on-column* e uma coluna com 2m de comprimento e 1/8” de diâmetro e enchimento de 4% Carbowax 20M, 1% ácido trimesílico e 80-120 carbopack BDA. As temperaturas utilizadas no injetor, detetor e forno foram, respetivamente, 150, 200 e 110 °C e o gás de arrastamento utilizado foi o hélio.
- ii. Índice de acidez (norma EN 14104:2003) – O método consiste na neutralização, por titulometria ácido-base, dos ácidos gordos livres contidos na toma de amostra. Por índice de acidez entende-se a massa de hidróxido de potássio, expressa em miligramas, necessária para neutralizar os ácidos gordos contidos num grama de gordura ou óleo.

3.4. Ensaaios de fermentação

Com vista à produção de etanol e de biomassa rica em óleo, utilizando glicerina pré-tratada como fonte de carbono, realizaram-se processos fermentativos com leveduras produtoras de álcool e de óleo (**Tabela 3.2**) que foram inoculados com células provenientes de culturas de pré-inóculo em fase exponencial de crescimento.

Para os pré-inóculos, as leveduras foram inoculadas de ansada a partir de rampas. O crescimento da levedura foi realizado em frascos *erlenmeyer* de 500 mL contendo 250 mL de meio de cultura MC (**Tabela 3.4**) com glucose como fonte de carbono e tapados com rolha de algodão. Cada pré-inóculo foi incubado a uma temperatura de 30°C e 150 rpm, sob agitação orbital.

3.4.1. Produção de etanol

A eficiência de utilização da glicerina pré-tratada por leveduras produtoras de álcool foi avaliada através da realização de ensaios fermentativos, com as diversas leveduras testadas (**Tabela 3.2**) em meio MC (**Tabela 3.4**) usando, como fonte de carbono, glicerina não refinada pré-tratada a pH=5 com HCl (7,5 g/L em glicerol). Paralelamente foram ainda realizados, para comparação, ensaios com glicerina comercial (87%; 7,5 g/L em glicerol) em meio MC e ensaios com glicerina não refinada pré-tratada a pH=5 com HCl (7,5 g/L em glicerol) em meio MC em que não foi adicionado extrato de levedura.

A fermentação decorreu em frascos *erlenmeyer* de 500 mL, contendo 250 mL de meio de cultura. Estes foram tapados com rolhas de borracha perfuradas com agulhas, de forma a assegurar condições anaeróbias para a levedura.

Os meios de fermentação foram inoculados com 2,5 mL de concentrado de células proveniente de um pré-inóculo em fase exponencial de crescimento (aproximadamente 16h). As células foram previamente recolhidas, concentradas por centrifugação durante 7 min a 10 000 rpm e 24 °C, lavadas por duas vezes com água destilada esterilizada e finalmente ressuspensas num volume adequado para obter uma suspensão com uma leitura de densidade ótica (DO) a 640nm de 50. Após inoculação os frascos foram incubados a 30°C e 150 rpm, sob agitação orbital.

Em todos os ensaios foram recolhidas amostras ao longo do tempo para caracterização em termos de biomassa (densidade ótica a 640 nm) e, após centrifugação (5 min a 15000 rpm) e filtração (filtros de acetato de celulose com porosidade de 0,2 µm e diâmetro de 13 mm), avaliação do glicerol consumido e da quantidade de etanol e de ácido acético produzidos (análise por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC)). No final de cada ensaio foi ainda realizada uma determinação do peso seco de levedura no frasco.

- i. Peso seco - A determinação do peso seco foi realizada filtrando em filtros (microfibra de vidro, GF/C, 47 mm) previamente secos e tarados, em duplicado, sob vácuo, tomas de 10 mL de meio. Os filtros contendo as células foram secos em estufa a 80°C durante a noite e pesados após arrefecimento em exsiccador durante 30 min.
- ii. Quantificação por HPLC – Para avaliação da variação das concentrações de glicerol, etanol e ácido acético ao longo da fermentação, as amostras (20 µL de volume de injeção) foram analisadas num cromatógrafo equipado com uma coluna Aminex HPX-87H. A temperatura da coluna era de 50 °C, decorrendo a análise a um fluxo de 0,5 mL/min de uma solução de ácido sulfúrico 5 mM previamente preparada, filtrada (filtros com poro 0,2 µm e diâmetro de 47 mm de polietersulfona hidrofílica) e desgaseificada. Para calibração usaram-se soluções de glicerol, etanol e ácido acético nas gamas de 1 - 20 g/L, 0,6 – 12 g/L e 0,2 – 4 g/L respetivamente.

3.4.2. Produção de biomassa rica em óleo

A produção de biomassa rica em óleo foi estudada através da realização de ensaios em frascos *erlenmeyer* de 500 mL, contendo 250 mL de meio MC usando como fonte de carbono a glicerina pré-tratada a pH 5 com HCl (7,5 g/L em glicerol). Estes foram inoculados com células (2,5 mL) em crescimento exponencial recolhidas e concentradas como descrito em 3.4.1, tapados com rolhas de borracha perfuradas com agulhas e incubados a 30°C e 150 rpm, sob agitação orbital. Dado que, para avaliação da quantidade de óleo nas células, é necessária uma toma de amostra de cerca de 100 mg em peso seco (secção 3.2 - vii) inocularam-se, para cada tipo de levedura, 6 frascos.

Foram recolhidas ao longo do tempo amostras (5 mL/frasco) de todos os frascos, que se reuniram num lote de composição média, para caracterização em termos de biomassa (DO a 640 nm e peso seco (secção 3.4.1 - i)). Após centrifugação do volume restante (19 mL), durante 7 min a 10 000 rpm, realizou-se no *pellet* obtido a avaliação da quantidade de óleo produzido, através da derivatização dos lípidos e ácidos gordos em ésteres e determinação destes por CG (Secção 3.2 - vii). No final de cada ensaio foi ainda realizada, no sobrenadante, a determinação, por HPLC (Secção 3.4.1 - ii), da quantidade de glicerol consumido.

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

4.1. Caracterização físico-química da matéria-prima

O trabalho iniciou-se com a caracterização de três amostras de glicerina não refinada provenientes de processos industriais de produção de biodiesel. Nestas amostras foram avaliadas algumas propriedades físico-químicas como o pH, e os teores em glicerol, sabões, cinzas, metanol e MONG (**Tabela 4.1**).

Tabela 4.1- Caracterização físico-química de amostras de glicerina não refinada (nd – não detetado).

				Valores de referência (Pal e Chaurasia, 2016)	
Parâmetro	Amostra A	Amostra B	Amostra C	OAU	Óleos vegetais
pH	8,91	5,30	12,03	-	-
Teor em glicerol (% m/m)	37,7 ± 0,9	80,9 ± 3,0	70,6 ± 0,6	27-30	65-75
Teor em sabões (% m _{oleato} /m)	21,7 ± 0,2	nd	3,5 ± 0,3	-	5
Teor em cinzas (% m/m)	5,02 ± 0,00	5,60 ± 0,06	3,75 ± 0,13	2-3	10
Teor em metanol (% m/m)	7,64 ± 0,09	0,01 ± 0,00	23,96 ± 0,02	-	0,5
Teor em água (% m/m)	6,86 ± 0,02	10,74 ± 0,07	0,83 ± 0,01	5-8	10
Teor em MONG (% m/m)	50,46 ± 0,99	2,73 ± 3,17	24,85 ± 0,72	50-61	5

Como se pode observar, a glicerina não refinada é formada por uma mistura contendo o glicerol produzido na reação de transesterificação, ácidos gordos livres sob a forma de sabões, o metanol que não foi consumido na reação e outros contaminantes. As concentrações desses componentes na glicerina não refinada dependem da matéria-prima e do processo utilizado para a produção de biodiesel apresentando, por isso, diferenças bastante significativas nas amostras em estudo.

A) pH

Constata-se que as amostras A e C apresentavam alcalinidade ($\text{pH} > 7$), indicando que na reação de transesterificação para produção de biodiesel foi utilizada uma catálise básica, que é processo mais comum na produção deste biocombustível (Kayode e Hart, 2017). Contudo, a amostra B, apesar de ter origem na mesma instalação que a amostra C (**Tabela 3.1**), que usa catálise básica tradicional, exibiu um valor de pH ácido, indiciando a possibilidade de que a amostra tenha sido recolhida noutra etapa do processo, nomeadamente já após um passo de pré-tratamento.

B) Glicerol

O teor em glicerol é um dos parâmetros mais importantes que permite estabelecer a qualidade da glicerina produzida nas indústrias de biodiesel. As amostras B e C, apresentavam um maior teor em glicerol comparativamente à amostra A, devendo-se este facto, provavelmente, à qualidade da matéria-prima usada na produção do biodiesel pois a instalação industrial processa óleos alimentares usados (OAU).

Segundo os valores de referência indicados na literatura (**Tabela 4.1**), a utilização de OAU como material de partida para a produção de biodiesel traduz-se num teor em glicerol entre 27-50 % m/m na glicerina resultante, ao passo que, usando óleos virgens esse teor é bastante mais elevado (65-75 % m/m). Atualmente, muitas indústrias têm optado pela mistura de matérias-primas, isto é, junção de óleos vegetais, OAU e/ou gordura animal para a produção de biodiesel, fazendo com que se obtenha um teor em glicerol ligeiramente inferior ao obtido com óleos virgens, mas com redução dos custos de produção do biocombustível.

C) Sabões

Relativamente aos sabões, estes constituem, muitas vezes, uma parte importante das impurezas presentes na glicerina bruta, e são formados devido à reação de saponificação entre os ácidos gordos livres presentes na matéria-prima e o catalisador básico utilizado na transesterificação (Rodrigues *et al.*, 2016).

A amostra A apresentava um teor em sabões de 21,7 % m/m, sendo este valor muitíssimo superior ao obtido para a amostra C (3,5 % m/m). A partir do teor de sabões pode-se verificar que, em 100 g de glicerina não refinada, estavam presentes 67,6 e 11,0 mmol de ácidos gordos livres nas amostras A e C, respetivamente.

Na amostra B não foi possível realizar a determinação do teor em sabões na medida em que não foi observável o ponto de viragem do indicador azul de bromofenol na titulação com ácido forte (HCl 0,5 N), significando que os ácidos gordos livres já haviam sido removidos da glicerina.

D) Cinzas

O teor de cinzas pode fornecer informações importantes sobre o catalisador utilizado no processo de transesterificação.

Nas amostras analisadas não existiram variações muito significativas neste teor, sendo o valor máximo de 5,60 % m/m referente à amostra B. Um teor de cinzas mais elevado pode ser consequência dos tratamentos efectuados na fase da glicerina após o processo de produção de biodiesel, envolvendo a utilização de ácidos minerais (Rodrigues *et al.*, 2016).

E) Água

A presença de água na glicerina não refinada pode dever-se a vários fatores:

- i. Qualidade do material de partida, isto é, quantidade de água presente na matéria-prima utilizada na transesterificação e consequente produção do biodiesel e da glicerina bruta;
- ii. Processo de purificação do biodiesel: este pode ser efetuado por lavagem com água ou por troca iónica. As indústrias de produção de biodiesel que adotam a purificação por via húmida (lavagem com

água) incorporam na fase residual de glicerol, previamente separada, uma parte da água residual contendo sabões, para posterior tratamento e recuperação dos ácidos gordos livres;

iii. Higroscopicidade da glicerina: é necessário considerar o facto de a glicerina ser altamente higroscópica e, por isso, absorver humidade do ambiente envolvente, o que resulta num aumento do teor de água nas amostras (Rodrigues *et al.*, 2016; Dhabhai *et al.*, 2016);

iv. Processo de pré-tratamento da glicerina: quando se dá a adição de ácido na glicerina, os sabões reagem com a base ainda presente e são convertidos a ácidos gordos e água (Sebastian *et al.*, 2016).

Como se pode constatar, a amostra C era aquela que apresentava um teor de água mais reduzido (aproximadamente 1 % m/m), seguida da amostra A com 6,86 % m/m, refletindo provavelmente o tipo de matéria-prima de partida, óleos vegetais virgens e OAU respetivamente. Por fim, a amostra B continha 11 % m/m, indiciando a possibilidade de ter ocorrido pré-tratamento de neutralização.

F) Metanol

Em relação ao teor em metanol, a sua concentração reflete a quantidade adicionada durante a produção de biodiesel pois é usado excesso de metanol para obtenção de alta produtividade de biodiesel, que se distribui no final entre as fases dos ésteres metílicos e da glicerina bruta (Pal e Chaurasia, 2016; Marx, 2016). A concentração de metanol foi muito variável entre as amostras analisadas, tendo a amostra C apresentado um valor superior de metanol. A amostra B, apresentava um teor residual (<0,01 % m/m) de metanol indicando que este havia sido removido da fase da glicerina.

G) Matéria orgânica não-glicerol

Em termos da matéria orgânica não-glicerol (MONG), esta é composta pelos subprodutos do processo de transesterificação (mono-, di- e triglicéridos), bem como ácidos gordos livres e outras impurezas orgânicas (Nanda *et al.*, 2014). A presença de um elevado teor em MONG é, portanto, devido à presença de sabões, metanol e glicéridos que não reagiram, tal como observado para as amostras em estudo.

Das amostras de glicerina em estudo, os valores dos parâmetros analisados para a amostra B demonstraram que esta tinha passado previamente por um processo de pré-tratamento, uma vez que apresentava altos teores em glicerol, água e cinzas e um valor de pH inferior a 7. Para além disso, não foi detectada presença de sabões e metanol, que terão sido removidos.

Efetuando uma comparação entre as amostras restantes, constata-se que a amostra A apresenta um teor em sabões, MONG e cinzas mais elevados, resultantes do facto de a matéria-prima de origem ser um resíduo. Além disso, a quantidade de glicerol é bastante mais reduzida. Todos estes fatores comprometem a qualidade da glicerina e a possibilidade de produção de novos biocombustíveis a partir deste resíduo utilizando microrganismos.

Dado o facto de a maior fatia da produção de biocombustíveis em Portugal resultar da utilização de óleos virgens, decidiu-se prosseguir o trabalho com a amostra C, cujas características representam a maior parte da glicerina não refinada produzida no país.

Assim, na amostra selecionada, efetuou-se também uma caracterização do perfil em ácidos gordos por conversão a ésteres dos ácidos presentes na forma de sabões e de glicéridos, e uma determinação direta do teor em ésteres metílicos. Para esta última determinação mencionada, obteve-se um valor nulo, o que significa que na glicerina não estava presente biodiesel. Através da transformação dos sabões em ésteres

metílicos determinou-se um teor em ácidos gordos de 2,18 % m/m com a composição descrita na **Tabela 4.2**.

Tabela 4.2- Composição em ácidos gordos da glicerina não refinada (amostra C).

Ácido gordo	(% m/m)
C16:0	9,71 ± 0,07
C18:1	38,96 ± 0,31
C18:2	37,90 ± 0,53
C18:3	10,33 ± 0,59
Outros	3,10 ± 0,18
Saturados	9,71 ± 0,07
Insaturados	87,19 ± 0,25

Os ácidos gordos presentes na glicerina não refinada são essencialmente constituídos por ácido oleico (C18:1 - 38,96 % m/m) e ácido linoleico (C18:2 - 37,90 % m/m) incluindo também percentagens significativas de ácido linolénico (C18:3 - 10,33 % m/m) e ácido palmítico (C16:0 - 9,71 % m/m). Esta composição é semelhante à que se encontra nos óleos vegetais (Thompson e He, 2006). Detetaram-se ainda picos de área muito reduzida que foram contabilizados num valor global designado por outros.

4.2. Pré-tratamento da matéria-prima

Após a caracterização e seleção da amostra de glicerina não refinada que melhor caracterizava o resíduo disponível em Portugal, realizou-se um estudo de otimização do seu tratamento para obtenção das várias frações constituintes, nomeadamente: sabões (AGL a usar para produção de biodiesel) e glicerol (a utilizar como fonte de carbono para microrganismos capazes de produzir etanol ou lípidos). O metanol pode ser recuperado por destilação para reintrodução no processo de produção de biodiesel.

4.2.1. Acidificação da glicerina para separação dos ácidos gordos livres

Uma redução do pH na glicerina bruta permite a reconversão dos sabões (resultantes da saponificação dos AGL no óleo durante a produção de biodiesel) em ácidos gordos livres, com formação de sais inorgânicos. A separação dos AGL permite, consequentemente, a obtenção de uma fase mais rica em glicerol. Assim, realizaram-se vários ensaios de acidificação de forma a estabelecer qual o ácido e o valor de pH mais adequados para o fim em vista (Hájek e Skopal, 2010).

A) Efeito do tipo de ácido

O desempenho de diferentes ácidos minerais, como HCl, H₂SO₄, H₃PO₄ e HNO₃, no processo de pré-tratamento, foi avaliado e comparado. Estes ácidos foram escolhidos por serem os mais simples e comuns.

Dos ácidos em estudo, o clorídrico e o sulfúrico são de longe os mais usados em processos de purificação de glicerina proveniente da produção de biodiesel. No entanto, devido ao potencial de produção de substâncias nocivas para o meio ambiente durante a adição destes ácidos, o uso do ácido fosfórico tem-se vindo a tornar uma opção mais adequada, não só por este ser mais ecológico, como também devido à produção de um sal de fosfato amplamente utilizado como fertilizante (Wan *et al.*, 2015).

Considerando que a glicerina não-refinada usada neste trabalho terá resultado de um processo de produção de biodiesel catalisado por metilato de sódio, o mais tradicional em Portugal, as reações de neutralização dos sabões por estes diversos ácidos traduzem-se nas seguintes equações (Eq. 4.1 a Eq. 4.4) (Nanda *et al.*, 2014):



Assim, neste estudo, a glicerina bruta foi acidificada individualmente (Secção 3.3.1-A) utilizando os diferentes ácidos, até um valor de pH de 6. Após acidificação e centrifugação, observou-se a separação de duas camadas líquidas distintas, uma camada superior de ácidos gordos livres e uma camada intermédia rica em glicerol (**Figura 4.1**). Dependendo do ácido utilizado, se o sal inorgânico formado é insolúvel ou pouco solúvel em água, pode ainda ocorrer precipitação durante o processo de acidificação, sendo assim notório o aparecimento de uma terceira camada sólida de precipitado de sais inorgânicos. Para além da separação das fases, visualizou-se ainda alteração da tonalidade da glicerina, que se tornou mais clara, evidenciando que o processo de pré-tratamento foi eficiente na separação de impurezas.

Nos ensaios realizados com ácido sulfúrico não se observou separação da camada orgânica contendo os AGL.

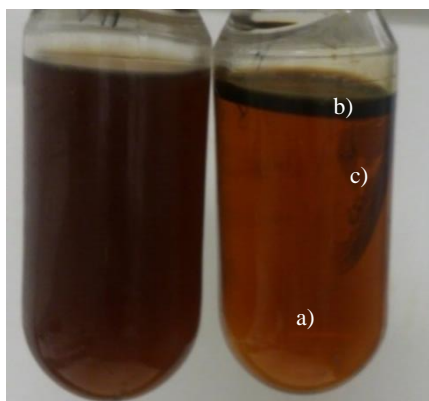


Figura 4.1- Efeito da acidificação numa amostra de glicerina não refinada (imagem da esquerda - glicerina não-refinada; imagem da direita-glicerina após acidificação e centrifugação; a) fase aquosa rica em glicerol, b) fase orgânica contendo ácidos gordos livres e c) precipitado de sais inorgânicos e outras impurezas).

A **Figura 4.2** apresenta uma comparação da eficiência dos diferentes ácidos na purificação da glicerina não refinada em relação ao rendimento em ácidos gordos livres, glicerina e teor em glicerol. É importante notar que os ácidos gordos livres determinados nas frações orgânicas incluem não apenas os que originalmente existiam na glicerina bruta, mas também aqueles que se converteram pelos sabões por acidificação (Hu *et al.*, 2012).

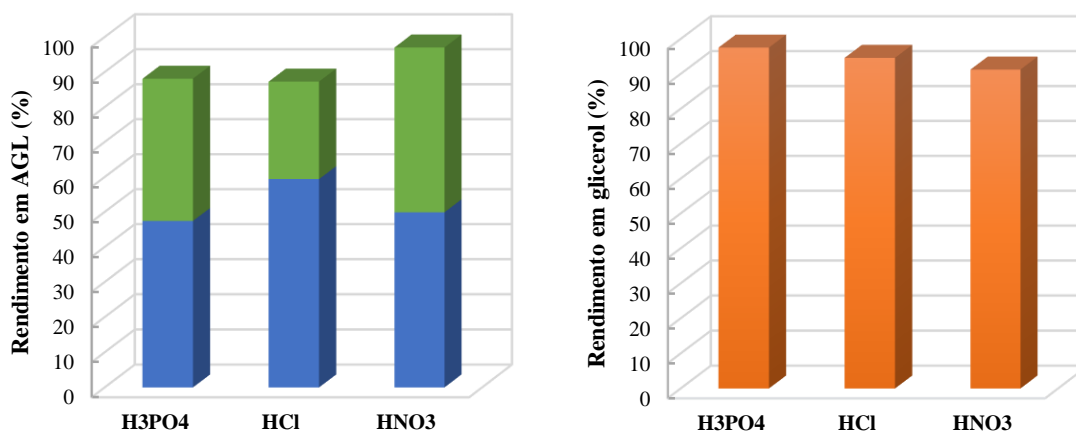


Figura 4.2- Efeito do tipo de ácido na eficiência da neutralização a pH 6 de glicerina não refinada, para separação de AGL (■ - fase aquosa; ■ - fase orgânica) e glicerol (■ - fase aquosa).

É possível verificar através da **Figura 4.2** que o ácido clorídrico otimiza a recuperação dos ácidos gordos livres, apresentando um rendimento de 59,4% obtendo-se o menor rendimento com H₃PO₄ (47,1%). No entanto, é com este último que se obtém o valor máximo para o teor final de glicerol (74,5% m/m) correspondente a uma recuperação de 97,5% na fase de glicerina.

Avaliando a diferença percentual dos resultados obtidos para os ácidos com melhores resultados na recuperação de AGL e glicerol, observa-se que o HCl apresenta uma pequena diferença no teor em glicerol (-2%) em relação ao obtido para H₃PO₄, permitindo, no entanto, obter mais 12% de AGL. Assim, decidiu-se continuar o estudo usando ácido clorídrico. Para esta decisão pesou ainda um outro fator importante que é o custo do ácido (**Tabela 4.3**), tendo em conta os volumes gastos para a neutralização, já que o custo do processo utilizando ácido clorídrico é também o mais reduzido.

Tabela 4.3- Custo do processo de acidificação de glicerina não refinada.

Ácido	Pureza	Preço s/ IVA (€/25 L)	Marca	Volume gasto (mL/kg)	Custo (€/ton)
HCl	37%	41,18	Panreac	46	75,77
H ₃ PO ₄	85%	160,65	Panreac	32	205,63
HNO ₃	65%	79,50	Fisher Chemicals	42	133,56

B) Efeito da adição de solvente

Com vista a melhorar o rendimento de recuperação dos AGL e facilitar a sua separação, tentou-se aumentar a espessura da camada orgânica. Assim, testou-se o efeito da adição de um dado volume de hexano (solvente com elevada afinidade para óleos e gorduras) na ampola de separação. Na **Figura 4.3** pode-se observar a separação final de fases resultante da adição de hexano à glicerina não refinada acidificada com HCl a pH 6.

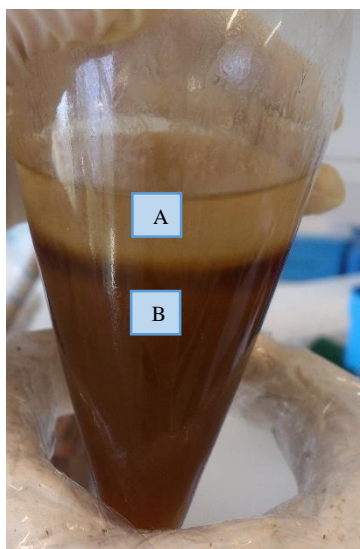


Figura 4.3- Separação de fases numa amostra de glicerina não refinada acidificada a pH 6 após extração com hexano (A – fase do hexano contendo os AGL; B – fase aquosa contendo a glicerina).

Após separação por decantação e evaporação do solvente na fase orgânica obteve-se uma fase correspondendo a 1,60% da massa inicial de amostra e que continha 75% de AGL. O rendimento de recuperação foi de 57,5%, semelhante ao determinado no ensaio sem adição de solvente. Constatou-se, portanto, que a adição de hexano não representou qualquer efeito benéfico no rendimento de recuperação. Este resultado mostrou que, apesar de na amostra de glicerina acidificada se formar uma camada muito pequena de ácidos gordos dificultando a separação de fases, a centrifugação é o método de separação de fases mais indicado para uma recuperação eficaz, embora se traduza num gasto energético extra.

C) Efeito do pH

Após a seleção do HCl como o ácido mais adequado para o processo de acidificação de glicerina não refinada, e tendo definido o melhor método de separação a usar, estudou-se o efeito do pH no rendimento do processo tendo em vista a otimização da recuperação dos AGL, pois a pH 6 restavam ainda cerca de 30% na fase aquosa que continha o glicerol (**Figura 4.2**).

Procedeu-se então à acidificação de novas amostras de glicerina não refinada ajustando o valor de pH final na gama de 3 a 6, tendo-se observado que a redução do valor de pH otimiza o rendimento de separação dos AGL (**Figura 4.4**).

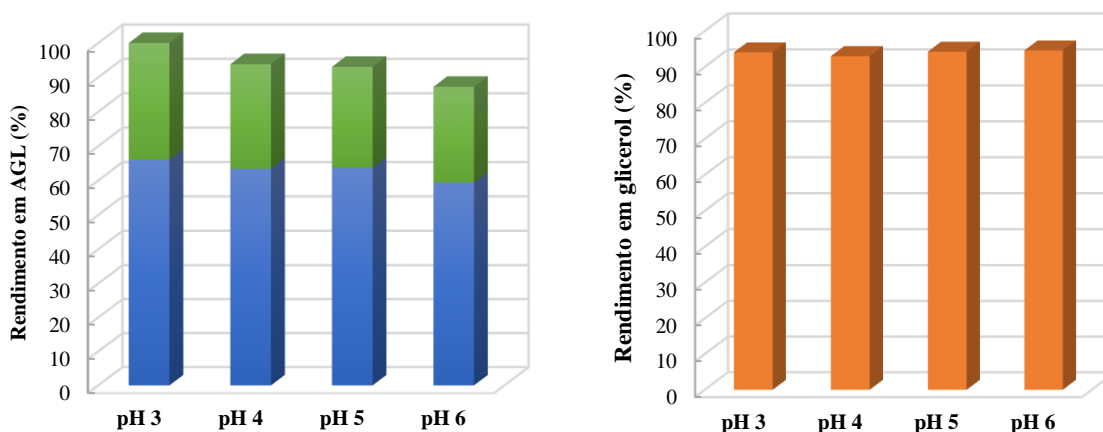


Figura 4.4- Efeito do pH na eficiência da neutralização com HCl de glicerina não refinada para recuperação de AGL (■ - fase aquosa; ■ - fase orgânica) e glicerol (■ - fase aquosa).

A variação na eficiência de separação do glicerol na gama estudada foi quase nula, mantendo-se sempre o rendimento acima de 93%, ao passo que para a recuperação dos AGL (fase orgânica) se observou uma variação de aproximadamente 7%, entre os valores de pH 3 e 6, obtendo-se valores semelhantes para os níveis 4 e 5, ligeiramente inferiores ao obtido a 3. Definiu-se então o potencial hidrogeniónico de 5 como o valor ótimo a considerar para a recuperação dos AGL, na medida em que o pequeno ganho em rendimento (~2%) com a redução do valor de pH de 5 para 3 não compensa a diferença na quantidade de ácido necessária ao ajuste, que tem um elevado custo associado.

4.2.2. Caraterização da glicerina não refinada após tratamento

Através do estudo do efeito do ácido e do pH, concluiu-se, portanto, que a adição de HCl para uma redução a pH 5 da glicerina não refinada, otimiza o processo de separação dos AGL do glicerol. Assim, e nas condições consideradas como as mais adequadas, repetiu-se o ensaio em duplicado com uma toma de amostra mais significativa (500 g de glicerina não refinada) de modo a permitir a obtenção de volumes homogêneos adequados e suficientes para a realização dos vários estudos subsequentes previstos neste trabalho. As 2 fases obtidas foram então caracterizadas com mais pormenor, tendo sido obtidos para a fase rica em AGL os resultados apresentados na **Tabela 4.4**.

Tabela 4.4- Caracterização da fase orgânica rica em AGL obtida após acidificação da glicerina não refinada (pH 5, HCl)

Parâmetros		Ácidos gordos % (m/m)
Composição em ácidos gordos	C14:0	0,20 ± 0,00
	C16:0	9,20 ± 0,01
	C16:1	0,25 ± 0,02
	C18:0	2,26 ± 0,03
	C 18:1	40,67 ± 0,10
	C18:2	39,04 ± 0,06
	C18:3	7,01 ± 0,05
	C20:0	0,09 ± 0,00
	C22:0	0,06 ± 0,01
	C22:1	0,19 ± 0,01
	C24:0	0,08 ± 0,02
	Outros	0,95 ± 0,03
Índice de Acidez (mg KOH/g)	Saturados	11,89 ± 0,05
	Insaturados	87,16 ± 0,04
		58,17 ± 0,72
Acidez (% em ácido oleico)		29,28 ± 0,36
Metanol (% m/m)		0,10

A **Tabela 4.4** mostra que a composição dos ácidos gordos presentes na fase de AGL da glicerina refinada pré-tratada é essencialmente constituída por ácido oleico (C18:1 - 40,67 % m/m), ácido linoleico (C18:2 - 39,04 % m/m) ácido palmítico (C16:0 - 9,20 % m/m) e ácido linolénico (C18:3 - 7,01 % m/m). Encontra-se ainda na sua composição, mas em muito menor percentagem, os ácidos mirístico (C14:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), araquídico (C20:0), beénico (C22:0), erúico (C22:1) e lignocérico (C24:0). Neste caso a concentração dos AGL na amostra já permitiu uma identificação dos picos de menores áreas, ao contrário do observado na análise da glicerina não refinada original (**Tabela 4.1**). De acordo com literatura, a composição e tipo de ácidos gordos disponíveis nesta fase dos AGL são semelhantes aos que se encontram em óleos e gorduras (Mahmudul *et al.*, 2017).

Importa referir ainda que nesta fase a percentagem de ácido linolénico (C18:3 - 7,01 % m/m), bem como a de ácidos gordos polinsaturados (≥ 4 duplas ligações - <0,95 % m/m, por se encontrarem englobados na fração outros) são inferiores aos limites especificados na norma EN 14214, 12 % m/m e 1% m/m respetivamente, para que se possa obter um biodiesel de qualidade no que respeita a estes parâmetros.

Os ácidos gordos livres obtidos do tratamento da glicerina podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de biodiesel por conversão dos mesmos em ésteres metílicos, numa reação de esterificação. No entanto, é essencial tomar em consideração a quantidade de metanol presente na

matéria-prima e o índice de acidez da mesma para determinação da quantidade precisa de catalisador ácido e metanol (razão metanol:AGL) a adicionar aos AGL para uma conversão eficaz.

Relativamente à quantidade de metanol, esta apresentava um teor bastante reduzido (0,10 % m/m) resultante da partição entre as duas fases obtidas. Quanto ao índice de acidez, a fase orgânica resultante da separação apresentava um alto valor (58,20 mg KOH/g) indicando assim a elevada quantidade de ácidos gordos livres presentes.

Apesar de não ter sido efetuada uma produção de biodiesel com esta matéria-prima, mas tendo em vista a sua possível realização, pode afirmar-se que dado o elevado teor de ácidos gordos livres presentes seria necessário realizar um processo de catálise ácida. Na conversão de AGL em ésteres poderia assim utilizar-se ácido sulfúrico como catalisador e metanol como álcool, uma vez que são os reagentes atualmente mais empregues nesta conversão (Vávra *et al*, 2017).

Após o processo de acidificação, para tratamento da glicerina não refinada, obteve-se também uma fase rica em glicerol que se caracterizou, procedendo-se à comparação com os parâmetros obtidos para a amostra de glicerina não refinada original, para avaliar o efeito da acidificação (**Tabela 4.5**).

Tabela 4.5- Caracterização físico-química da glicerina não refinada tratada por acidificação com HCl a pH 5.

Parâmetro	Glicerina não refinada tratada	Glicerina não refinada	Variação (%)
pH	5,08	12,03	-
Teor em glicerol (% m/m)	69,0 ± 0,9	70,6 ± 0,6	-2
Teor em cinzas (% m/m)	4,14 ± 0,03	3,75 ± 0,13	+10
Teor em metanol (% m/m)	12,27 ± 0,10	23,93 ± 0,02	-49
Teor em água (% m/m)	7,30 ± 0,42	0,83 ± 0,01	+783
Teor em MONG (% m/m)	19,5 ± 0,4	24,8 ± 0,7	-21

Como é notório na tabela acima, através da acidificação da glicerina não refinada obtiveram-se variações percentuais, para os parâmetros de caracterização estudados, tanto negativas como positivas.

Primeiramente, observa-se que o teor em glicerol se manteve praticamente inalterado. Contudo, segundo Pal e Chaurasia (2016), seria esperado o aumento deste parâmetro com o pré-tratamento da amostra por remoção de alguns componentes. No entanto, o resultado obtido deve-se principalmente ao aumento abrupto da quantidade de água na glicerina tratada (de 0,8 para 7% m/m), que não permitiu que se observasse qualquer efeito de concentração resultante da remoção dos AGL. O aumento drástico do teor em água ocorreu provavelmente como consequência da higroscopicidade da glicerina e, consequentemente, por absorção da humidade do ambiente envolvente (Dhabhai *et al.*, 2016).

Tal como esperado, na glicerina não refinada tratada não foi possível determinar o teor em sabões, uma vez que todos os sabões presentes na glicerina original foram convertidos a AGL e posteriormente separados.

O valor do teor em cinzas aumentou 10% em relação à glicerina sem acidificação, como consequência da adição do ácido mineral (HCl), uma vez que a neutralização dos sabões se dá com formação de um sal constituído pelo anião do ácido e o catião dos sabões presentes na amostra de glicerina não refinada. No caso presente, o anião do ácido HCl (Cl⁻) combina-se com o catião dos sabões presentes na amostra da glicerina (Na⁺) resultante da ação do catalisador básico. Os sais formados (NaCl), como são muito

solúveis em água, permanecem na fase da glicerina, fazendo aumentar o teor em cinzas após acidificação.

Relativamente ao teor em metanol, este diminuiu cerca de 50% face ao valor inicial na glicerina não refinada. Como até esta fase não foi efetuado qualquer processo de evaporação, e na fase dos AGL a sua percentagem é quase nula, supõe-se que este evaporou naturalmente no decorrer do processo de acidificação e com o tempo de armazenamento.

Por fim, observou-se também uma diminuição no teor em MONG, tal como seria esperado, uma vez que houve diminuição do teor de metanol e da quantidade de sabões, que são substâncias orgânicas.

Posto isto, pode referir-se que o pré-tratamento da glicerina não refinada teve uma enorme importância para que esta possa ser usada em processos de fermentação para a produção de bioetanol, em que o glicerol atuará como fonte de carbono, de forma a evitar as seguintes incidências:

- Quando a glicerina bruta é misturada diretamente com a cultura microbiana para o processo de fermentação, o sabão precipita a partir de meios líquidos sendo prejudicial ao crescimento celular (Sivasankaran *et al.*, 2016);
- A presença de ácidos gordos e ésteres livres insaturados tem um efeito inibitório na difusão de glicerol através da membrana celular, afetando assim o crescimento microbiano e a formação de bioprodutos (Rivaldi *et al.*, 2017).

A primeira parte deste estudo consistiu assim em efetuar um tratamento de glicerina não refinada de modo a separar alguns componentes para reutilização. No entanto, apesar de não se ter conseguido um aumento da pureza da fase contendo glicerina, com o pré-tratamento obtiveram-se diferentes frações contendo compostos que poderão ser usados em processos de produção de biocombustíveis - biodiesel (AGL e metanol) e bioetanol (glicerol).

4.3. Ensaios de fermentação

Para a produção de etanol e de biomassa rica em óleo, aproveitando a glicerina pré-tratada como fonte de carbono, efetuaram-se ensaios de fermentação com várias leveduras produtoras de álcool e de lípidos (**Tabela 3.2**).

O primeiro passo foi a produção da levedura num pré-inóculo (secção 3.1.3) preparado com glucose (50 g/L), como fonte de carbono, e suplementado com fontes de vitaminas, azoto, enxofre, fósforo e magnésio entre outros compostos. A glucose é considerada um substrato de referência e pode ser assimilado pela maioria das leveduras (Papanikolaou *et al.*, 2017). As células de levedura usadas nos ensaios fermentativos foram colhidas em fase exponencial de crescimento, que é o período em que as células se encontram nas suas melhores condições de viabilidade, isto é, quando os seus mecanismos de transporte estão mais ativos, favorecendo a utilização de nutrientes e, portanto, o seu bom desempenho em processos biológicos.

Para que ocorra crescimento microbiano é necessário que um meio de cultura forneça nutrientes, mas também que se proporcione um ambiente físico adequado a cada microrganismo. Neste trabalho, os processos fermentativos decorreram em descontínuo, sendo todo o substrato fornecido no início da fermentação, e a incubação foi realizada a uma temperatura de aproximadamente 30°C e sob agitação

orbital de 150 rpm, condições ótimas para o crescimento das leveduras. O controlo da temperatura torna-se essencial dado que afeta o crescimento celular. Caso a temperatura aumente, por exemplo, a velocidade da fermentação irá consequentemente aumentar e as leveduras produtoras de álcool tornar-se-ão mais sensíveis à toxicidade do etanol gerado, assim como diminuirá a produção de lípidos por parte das leveduras oleaginosas, para além de que o aumento de temperatura eleva o risco de contaminação (Donot *et al.*, 2014). Relativamente à agitação contínua, esta faz com que não ocorra deposição da biomassa gerada, permitindo a dispersão do ar no meio de cultivo e homogeneização da temperatura, do pH e da concentração de nutrientes.

4.3.1. Produção de etanol

Com vista a analisar a eficiência de utilização de glicerina não refinada pré-tratada a pH 5 com HCl na produção de etanol, foram realizados ensaios fermentativos usando glicerol como fonte de carbono e diversas leveduras produtoras de álcool, *Pichia stipitis* CBS 181.F, *Saccharomyces cerevisiae I-uvarum* CCMMI 885, *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 6269 e *Saccharomyces bayanus* ATCC 66263.

Entre as leveduras mencionadas, as do tipo *Saccharomyces cerevisiae* são amplamente utilizadas na tecnologia de fermentação alcoólica, podendo crescer e metabolizar diversos tipos de açúcares, como glucose, frutose e sacarose (Sivasankaran *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017). No entanto, esta estirpe é também capaz de utilizar outras fontes de carbono, tais como glicerol, na produção de etanol (Yu *et al.*, 2010). Relativamente às restantes leveduras, não existem referências na literatura a estudos utilizando o glicerol como substrato para a produção de etanol. Contudo, estas produzem quantidades de etanol razoáveis quando na presença de outras fontes de carbono, como a glucose ou ainda como, no caso da *P. stipitis*, a xilose (Shi *et al.*, 2014).

Para além de serem capazes de produzir etanol, estas leveduras podem gerar também outros produtos secundários derivados do processo de fermentação (ex: ácido acético, ácido láctico, entre outros), dependendo da via metabólica utilizada (Zabed *et al.*, 2017).

Os ensaios para avaliação da eficiência fermentativa destas leveduras foram realizados com inoculação de células recolhidas de pré-inóculos em fase exponencial em meio contendo uma composição base de sais e extrato de levedura (**Tabela 3.4**) (GT+EL+S) ou apenas sais (GT+S) e, como fonte de carbono, glicerina não refinada tratada a pH 5 com HCl numa concentração final de 7,5 g/L em glicerina. Para comparação foram também realizados ensaios substituindo a glicerina pré-tratada por glicerina comercial (87%) (GC+EL+S). O objetivo de testar o efeito da presença de extrato de levedura foi o de reduzir o custo do processo de fermentação dado que a glicerina não refinada tratada continha outros compostos provenientes do processo de produção de biodiesel que poderiam eventualmente serem suficientes para manter o adequado funcionamento do metabolismo celular.

4.3.1.1. Crescimento celular

O crescimento celular das leveduras em estudo ao longo dos ensaios de fermentação foi monitorizado através de medidas da absorvância a 640 nm de amostras recolhidas ao longo do tempo (**Figura 4.5**).

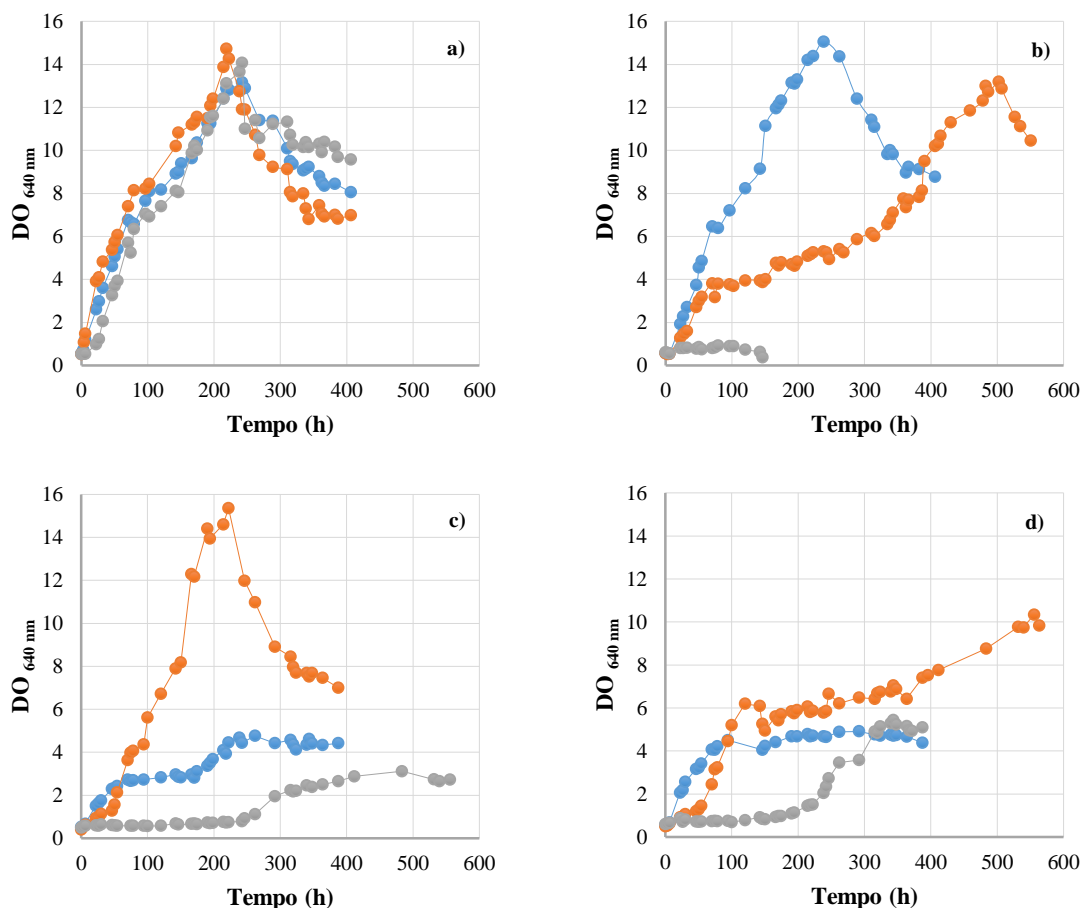


Figura 4.5- Curvas de crescimento das leveduras *P. stipitis* (a), *S. uvarum* (b), *S. carlsbergensis* (c) e *S. bayanus* (d) em meios de fermentação contendo 7,5 g/L de glicerina como fonte de carbono (biomassa inicial – 100 mg/L; 30°C; 150 rpm) (● GT+EL+S; ● GT+S; ● GC+EL+S).

Através da análise das curvas de crescimento em descontínuo para as leveduras estudadas, constata-se limitação do crescimento principalmente para a *S. bayanus* e a *S. carlsbergensis* que, no geral, atingiram menores teores máximos de biomassa demorando mais tempo em atingi-los (**Figura 4.5 e Tabela 4.6**).

Tabela 4.6- Valores de parâmetros de crescimento para diversas leveduras produtoras de etanol em meios com glicerina como fonte de carbono (T=30 °C; 150 rpm; biomassa_i = 100 mg/L; glicerol_i = 7,5g/L).

Parâmetro	Composição do meio	<i>P. stipitis</i>	<i>S. uvarum</i>	<i>S. carlsbergensis</i>	<i>S. bayanus</i>
μ (/h)	GT+S	0,042	-	0,023	0,016
	GT+EL+S	0,052	0,060	0,045	0,051
	GC+EL+S	0,053	0,038	0,027	0,023
DO _{640nm} máx	GT+S	14,08	-	3,12	5,43
	GT+EL+S	13,16	15,50	6,32	5,89
	GC+EL+S	14,73	13,20	15,35	10,34
t _{DOmáx} (h)	GT+S	243	-	484	344
	GT+EL+S	243	247	246	292
	GC+EL+S	219	507	222	556

Na maior parte dos ensaios fermentativos descritos, observou-se a inexistência de fase de latência no início dos ensaios, como era espectável, pois, uma vez que se inocularam com culturas de células em fase de crescimento exponencial (16 h de incubação em meio com glucose), os seus mecanismos de transporte estão mais ativos, favorecendo a boa utilização de nutrientes e uma rápida adaptação ao meio de fermentação.

Em geral, na fase inicial, quando todos os nutrientes estão presentes em excesso, os microrganismos dividem-se e a população cresce com uma taxa específica de crescimento máxima que depende do potencial genético do microrganismo, da composição do meio de cultura e das condições de crescimento (temperatura, pH, disponibilidade de água, etc). A esta fase seguem-se as fases de desaceleração e estacionária que ocorreram neste estudo após cerca de 230 h. Durante a fase de desaceleração ocorre o declínio da taxa específica máxima de crescimento, em resultado da diminuição para valores limitantes da concentração de um (ou mais) nutrientes essenciais ao metabolismo celular e/ou do aumento da concentração de produtos do metabolismo tóxicos para as células. Na fase estacionária o esgotamento de um nutriente essencial e/ou a acumulação de produtos inibidores do metabolismo leva a que divisão da população pare. Posteriormente, e apesar de em carência de nutrientes as células se poderem manter viáveis durante períodos de tempo mais ou menos longos, à custa das reservas endógenas, mais cedo ou mais tarde, verifica-se um declínio da concentração de células (fase de morte celular). Após as 230 h, e no caso das leveduras *S. uvarum* e *P. stipitis*, iniciou-se uma fase de morte, em que ocorreu a perda irreversível da capacidade de divisão celular originando um decréscimo da concentração de células viáveis na população microbiana.

No entanto, no caso dos ensaios com glicerina tratada, em meio com sais, verificou-se para as leveduras *S. carlsbergensis* e *S. bayanus* a ocorrência de longas fases de latência com 234 h e 150 h, respetivamente. Nestes ensaios fermentativos apurou-se que a presença do extrato de levedura pode ser determinante para o bom desenvolvimento das culturas já que este componente fornece vitaminas, azoto e aminoácidos ao meio de cultura, constituindo um excelente estimulante para o crescimento de leveduras (Thomas *et al.*, 2002).

Uma outra exceção neste estudo foi o ensaio de *S. uvarum* com glicerina tratada, na presença de sais, para o qual não se detetou qualquer crescimento durante 150 h, após o que se observou floculação das células no meio, não se tendo prosseguido o ensaio. A ocorrência de floculação dá-se devido a certos

fatores fisiológicos, tais como hidrofobicidade da parede celular, carga da superfície celular, topografia da superfície celular e idade celular (Nayyar *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos com as leveduras *S. bayanus* e *S. carlsbergensis* mostram que estas são mais sensíveis a contaminações respondendo melhor com glicerina pura comercial complementada com extrato de levedura e sais.

Nos ensaios fermentativos, verificou-se, portanto, que a *S. uvarum* e a *P. stipitis* foram as leveduras que responderam melhor à presença de glicerina proveniente de um processo de produção de biodiesel, e consequentemente menos pura, atingindo ao longo do tempo de fermentação níveis de crescimento bastante mais elevados (**Tabela 4.6**), o que indicia uma melhor capacidade de adaptação destas leveduras. Aliás, a *S. uvarum* apresentou mesmo um melhor desempenho com glicerina contaminada do que com glicerina pura atingindo um nível de crescimento maior e mais rápido. Já a *P. stipitis* apresentou comportamento idêntico nos 3 ensaios, independentemente da composição do meio (**Figura 4.5 a) e b)**) embora a taxa inicial de crescimento fosse superior em presença de glicerina tratada (**Tabela 4.6**).

4.3.1.2. Consumo de glicerol e produção de etanol e produtos secundários da fermentação

Neste estudo da influência da glicerina proveniente da produção de biodiesel como fonte de carbono para conversão em etanol por fermentação alcoólica foi também avaliada a evolução das quantidades de glicerol consumido (**Figura 4.6**) e de etanol produzido (**Figura 4.7**), com valores obtidos a partir das análises de HPLC. Do mesmo modo foi também avaliado o aparecimento no meio de eventuais produtos secundários da fermentação, tais como o ácido acético.

Analisando os gráficos de consumo de glicerol das leveduras (**Figura 4.6**) constata-se que o valor da concentração de glicerol residual, no final dos ensaios, varia substancialmente com a composição do meio e a origem da fonte de carbono utilizada, tendo os ensaios sido iniciados com uma concentração de glicerol de cerca de 7,5-8 g/L.

Nos ensaios com glicerina comercial pura no meio de fermentação, e para as quatro leveduras em estudo, observou-se total desaparecimento do glicerol, sendo que a concentração de glicerol decai mais drasticamente quando a levedura apresenta maior taxa de crescimento. Contudo, na fermentação envolvendo as leveduras *S. uvarum* (**Figura 4.6 b)**) e *S. bayanus* (**Figura 4.6 d)**) o consumo total de glicerol comercial observa-se muito mais tarde, pois também o crescimento foi bastante mais lento.

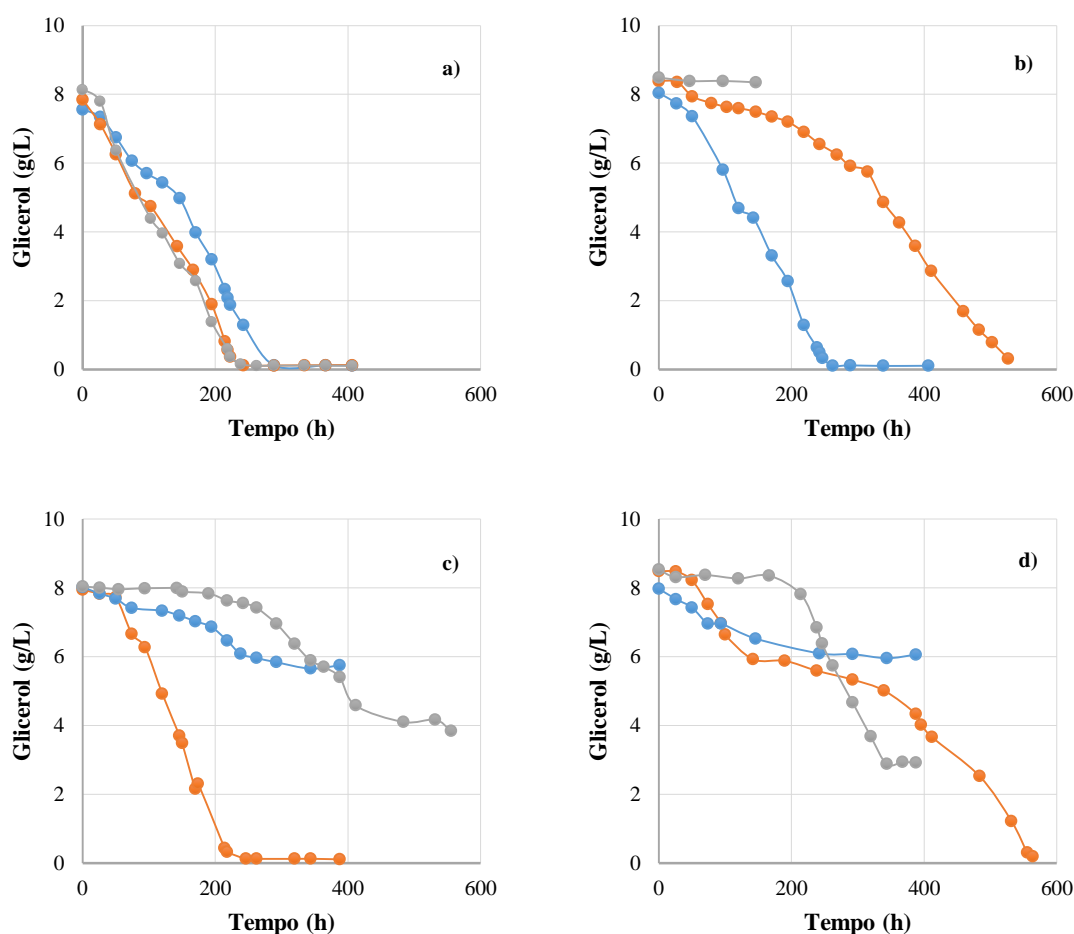


Figura 4.6- Consumo de glicerol por *P. stipitis* (a), *S. uvarum* (b), *S. carlsbergensis* (c) e *S. bayanus* (d) em ensaios de fermentação alcoólica usando glicerina não refinada tratada como fonte de carbono (biomassa_i = 100 mg/L; 30 °C; 150 rpm; glicerol_i = 7,5 g/L) (● GT+EL+S; ● GT+S; ● GC+EL+S).

Relativamente à levedura *P. stipitis* (**Figura 4.6 a**), verificou-se o desaparecimento da fonte de carbono em todos os ensaios após cerca de 250 h de fermentação, coincidindo este ponto com o máximo para o qual se observou crescimento (**Figura 4.5 a**), tal como se observou no ensaio com *S. uvarum* em meio mais completo (**Figuras 4.5 b** e **4.6 b**). Para os restantes ensaios envolvendo glicerina não refinada tratada não se observou consumo total do glicerol restando ainda por consumir cerca de 3-4 g/L quando se usou meio mais rico e 6 g/L utilizando apenas sais.

Este estudo tinha como objetivo avaliar a viabilidade de produção de etanol a partir de glicerina proveniente da produção de biodiesel. Contudo, constatou-se que no processo fermentativo não ocorreu conversão significativa de glicerol em etanol tendo-se obtido concentrações quase nulas do produto (< 250 mg/L; **Figura 4.7**). Os valores obtidos apresentavam uma elevada variabilidade devida provavelmente à conjugação entre baixas produções e evaporação resultante da abertura do sistema para retirada de amostra.

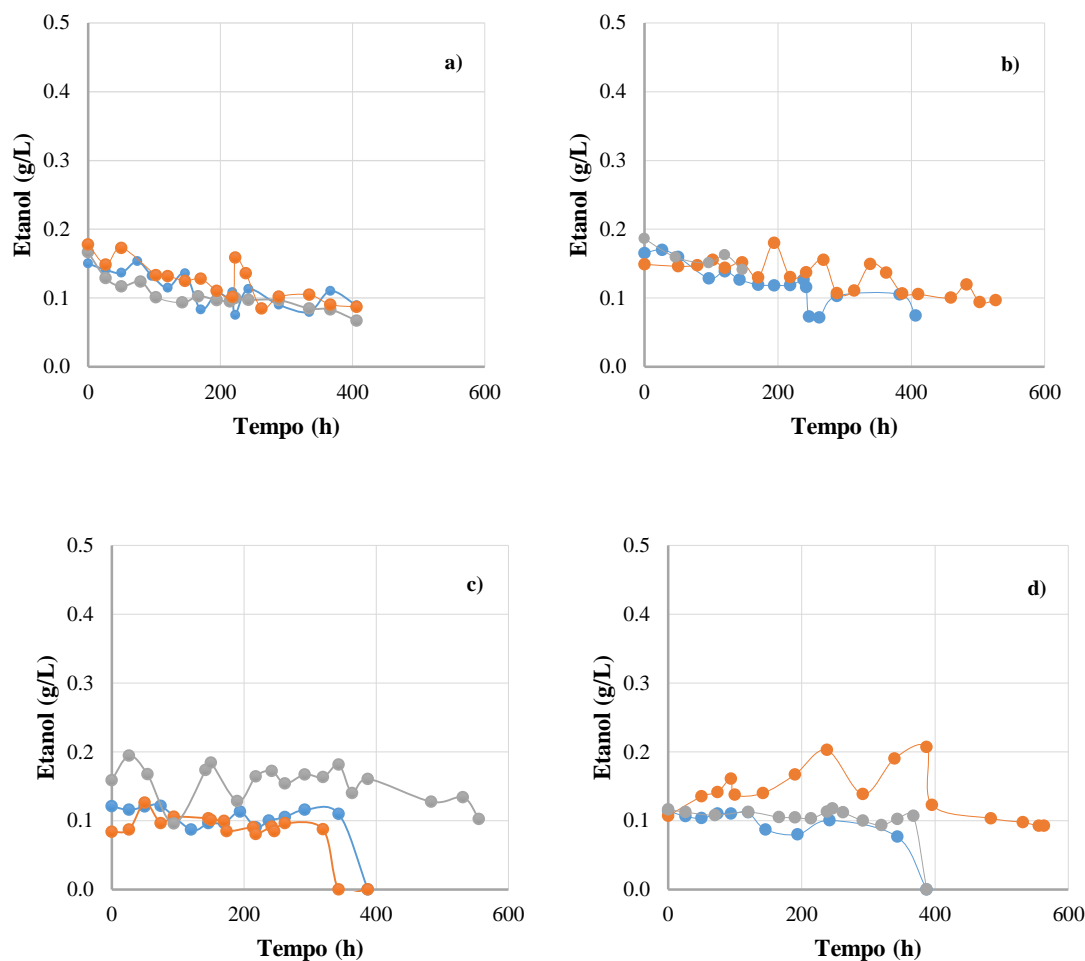


Figura 4.7- Produção de etanol por *P. stipitis* (a), *S. uvarum* (b), *S. carlsbergensis* (c) e *S. bayanus* (d) em ensaios de fermentação alcoólica usando glicerina não refinada tratada como fonte de carbono (biomassa_i = 100 mg/L; 30°C; 150 rpm; glicerol_i = 7,5 g/L) (● GT+EL+S; ● GT+S; ● GC+EL+S).

Como se pode observar, a concentração de etanol apresentava já um valor da ordem de 100-150 mg/L no início da fermentação, provavelmente devido a contaminação proveniente do pré-inóculo, apesar de se ter realizado lavagem por duas vezes com água destilada esterilizada do concentrado de células proveniente do pré-inóculo que se encontrava em fase exponencial de crescimento.

Para além de etanol, foi também analisada a eventual deteção no meio de produtos secundários de fermentação. Contudo, de todos os ensaios fermentativos realizados, somente nos ensaios envolvendo *P. stipitis* e *S. carlsbergensis* utilizando como fonte de carbono a glicerina comercial foi possível detetar a presença de ácido acético, após cerca de 214 h de fermentação. A concentração era de aproximadamente 80 mg/L, não tendo variado significativamente até ao final dos ensaios.

Os resultados obtidos demonstram que, apesar de ter ocorrido crescimento das leveduras, ocorreram também processos de inibição que não permitiram a obtenção do produto final desejado, tais como:

- O facto de o pré-inóculo ter sido realizado num meio onde a fonte de carbono utilizada era a glucose pode ter sido um dos fatores responsáveis pela baixa atividade em meio de glicerol, visto que a maquinaria celular estaria mais apta para a assimilação de glucose e não de glicerol;

- Ocorrência de outros processos a nível metabólico, uma vez que a utilização do glicerol pode ser dirigida para outras vias, que permitem obter outros produtos que, neste caso, não foram investigados.

4.3.1. Produção de biomassa oleaginosa

De forma a avaliar a possibilidade de utilização de glicerina não refinada pré-tratada a pH 5 com HCl como fonte de carbono em processos fermentativos para a produção de biomassa oleaginosa utilizaram-se duas leveduras produtoras de lípidos, *Rhodosporidium toruloides* NCYC 921 e *Rhodotorula mucilaginosa* IGC 5058. Estas encontram-se entre as mais importantes estirpes produtoras de *Single Cell Oil* (SCO), tendo sido recentemente reveladas as suas capacidades de conversão de glicerol em SCO, com potencial para conversão em biodiesel (Papanikolaou *et al.*, 2017).

4.3.1.1. Crescimento celular

Tal como para a produção de etanol, a determinação da evolução da concentração de células em suspensão, em meio fermentativo contendo glicerol como fonte de carbono, resultou da medida da absorvância a 640 nm de amostras recolhidas ao longo do tempo, obtendo-se assim curvas de crescimento (**Figura 4.8**). Além disso, foram também realizadas determinações do peso seco da cultura para que fosse possível contabilizar a produção lipídica.

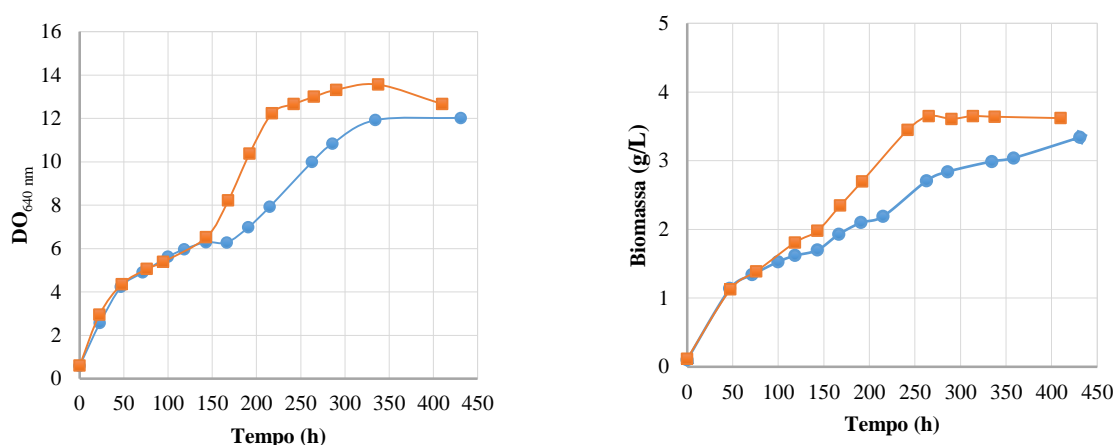


Figura 4.8- Curvas de crescimento das leveduras *R. toruloides* (●) e *R. mucilaginosa* (■) em meio de fermentação contendo 7,5 g/L de glicerol como fonte de carbono (biomassa_i = 100 mg/L; 30 °C; 150 rpm).

Durante o período de tempo que se segue à inoculação do meio de cultura, as células do microrganismo têm normalmente que se adaptar ao novo meio. Esta fase dita de latência (lag) pode ter uma duração mais ou menos extensa consoante o estado fisiológico da cultura usada como inóculo e as condições de crescimento. No entanto, pela representação gráfica das curvas de crescimento constata-se que, para ambas as leveduras em estudo, não é visível qualquer fase de latência ocorrendo crescimento exponencial imediato, o que demonstra não ter havido impacto pelo facto de se ter transferido a cultura de células de um pré-inóculo em fase de crescimento exponencial (24 h de incubação em meio com glucose) para um meio com diferente fonte de carbono embora com composição salina semelhante.

Constatou-se que as taxas específicas de crescimento inicial (**Tabela 4.7**) eram similares para as duas leveduras em meio rico com 7,5 g/L de glicerina. Seguidamente ao crescimento exponencial, iniciou-se uma fase de desaceleração com declínio da taxa específica de crescimento, em resultado, provavelmente, da diminuição para valores limitantes do crescimento da concentração de um (ou mais) dos nutrientes essenciais ao metabolismo celular (**Figura 4.8**). Esta fase terminou muito mais cedo para a levedura *R. mucilaginosa* do que para a *R. toruloides*, que atingiram a fase estacionária às 265 h e 334 h respetivamente (**Figura 4.7**). Os ensaios foram, contudo, mantidos até às 431 h para permitir maior acumulação de ácidos gordos pois, em muitos casos, a carência de nutrientes em fase estacionária conduz a que as células alterem o seu metabolismo para se manterem viáveis à custa de reservas endógenas que usam em processos de manutenção.

Tabela 4.7- Valores de parâmetros de crescimento para as leveduras *R. toruloides* e *R. mucilaginosa* em meio com glicerina tratada com HCl a pH 5 como fonte de carbono (T=30°C; 150 rpm; biomassa_i = 100 mg/L; glicerol_i = 7,5g/L).

Leveduras	μ_i (/h)	tempo (h)	X _{máx} (g/L)	t _{Xmáx} (h)
<i>R. toruloides</i>	0,064	0 - 24	3,31	334
<i>R. mucilaginosa</i>	0,070	0 - 23	3,63	265

Relativamente à produção de biomassa no processo fermentativo, é possível constatar que para a levedura *R. mucilaginosa* a produção máxima de biomassa foi de 3,63 g/L às 265 h de fermentação enquanto a *R. toruloides* atingiu uma produção de 3,31 g/L. O crescimento destas duas leveduras em glicerol foi, portanto, bastante moroso, atingindo-se os valores máximos após um tempo mínimo de 11 d para a *R. mucilaginosa*. A *R. toruloides* apresentou um ainda menor crescimento, traduzido numa menor produção em mais tempo.

4.3.1.2. Consumo de glicerol, produção de lípidos e composição em ácidos gordos

Dado que o processo de avaliação do teor em lípidos formados exigia tomas de amostra com volumes da ordem dos 15 mL, e este era o parâmetro mais importante para estes ensaios, foi decidido não fazer a avaliação da evolução da concentração de glicerol ao longo do tempo, mas apenas inicialmente e no final do processo. Os valores obtidos mostraram que durante os ensaios fermentativos a fonte de carbono (glicerol) foi consumida quase na sua totalidade para ambas as leveduras (**Tabela 4.8**). A levedura *R. mucilaginosa* consumiu um pouco mais de glicerol, tendo-se observado também maior quantidade de biomassa formada, valores que se traduziram num valor ligeiramente superior de rendimento em biomassa para este caso. Dos resultados obtidos, constata-se ainda que os rendimentos dos ensaios fermentativos, utilizando a glicerina não refinada pré-tratada como fonte de carbono, rondaram os 50%.

Tabela 4.8- Rendimento em biomassa e concentração final de glicerol para ensaios de fermentação de leveduras oleaginosas em meio com 7,5 g/L de glicerina como fonte de carbono (T=30 °C; 150 rpm; biomassa_i = 100 mg/L).

Leveduras	Glicerol _f (g/L)	Consumo de glicerol (%)	Y _{X/GH}
<i>R. toruloides</i>	0,81	89	0,48
<i>R. mucilaginosa</i>	0,48	94	0,50

Por estarmos perante uma fonte de carbono que, apesar de ter sido pré-tratada, ainda apresenta algumas impurezas, estas poderão ter influenciado negativamente o rendimento dos ensaios fermentativos, ao nível do crescimento celular e da acumulação lipídica (Liu *et al.*, 2017). Um estudo recente (Gao *et al.*, 2016) tentou averiguar se o aumento do conteúdo de impurezas afetaria a via da síntese lipídica, promovendo ou não a produção de lípidos, qual o mecanismo responsável por esta promoção, e qual o intervalo permitido para a concentração de impurezas, utilizando a levedura *R. toruloides* 32489. Neste estudo foi verificado que, embora o metanol exerça alguns efeitos tóxicos sobre a levedura reduzindo a produção de lípidos em 18%, esta produção em presença de impurezas como oleato de metilo, oleato de sódio e NaCl aumentou 47,0%, 68,0% e 64,0%, respetivamente. Quando o metanol é misturado com estas impurezas, o seu efeito de inibição é atenuado devido ao efeito promotor das outras substâncias.

Dado que neste trabalho se pretendia analisar o efeito da glicerina não refinada pré-tratada na produção de biomassa rica em óleo, quantificou-se também, ao longo do processo, o teor em ácidos gordos derivados dos lípidos presentes na biomassa (Secção. 3.2 - vii), tendo em conta que o objetivo deste trabalho seria a utilização posterior destes ácidos gordos como matéria-prima para a produção de biodiesel.

O teor de ácidos gordos nas células apresentava-se inicialmente elevado para ambas as leveduras analisadas, devendo-se ao estado de atividade do metabolismo celular durante o crescimento no pré-inóculo com glucose como fonte de carbono (**Figura 4.9**). Como resultado do impacto provocado pela presença no novo meio, as células usaram as suas reservas e o teor em ácidos gordos decresceu abruptamente durante a primeira fase de crescimento exponencial (24 h). A partir daí o decréscimo tornou-se mais lento, observando-se, no entanto, para a *R. toruloides* um ligeiro aumento (27 UA/mg) entre as 24 h e as 143 h de tempo de ensaio. No final do ensaio, quando já não se observava crescimento e o glicerol se encontrava praticamente esgotado, os teores de ácidos gordos nas células eram cerca de 20% do inicial (90 UA/mg e 52 UA/mg para a *R. toruloides* e a *R. mucilaginosa*, respetivamente). Tal diminuição do teor de lípidos sugere a eventual falta no meio de um nutriente necessário à sua síntese, associada à ativação por parte das células de metabolismos consumidores de energia para resposta às condições ambientais.

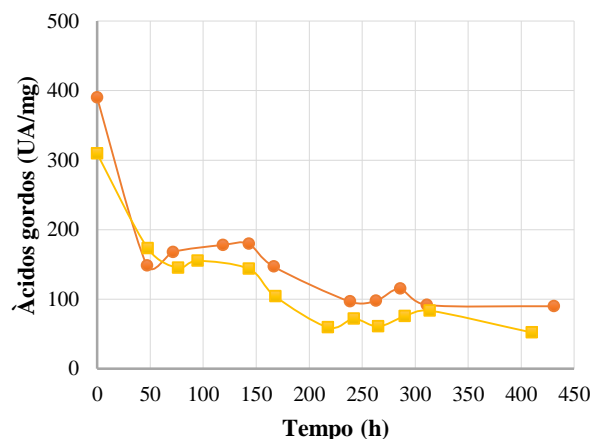


Figura 4.9- Quantidade de lípidos presente na biomassa de *R. toruloides* (●) e de *R. mucilaginosa* (■) ao longo do processo fermentativo (T=30°C; 150 rpm; biomassa_i = 100 mg/L; glicerol_i = 7,5g/L).

A análise cromatográfica para determinação do teor em ácidos gordos permitiu também conhecer a composição em ácidos gordos na biomassa de *R. toruloides* e de *R. mucilaginosa* (**Figura 4.10**). Os componentes predominantes nestas leveduras eram o ácido palmitoleico (C16:1), o ácido oleico (C18:1), o ácido linoleico (C18:2) e o ácido linolénico (C18:3).

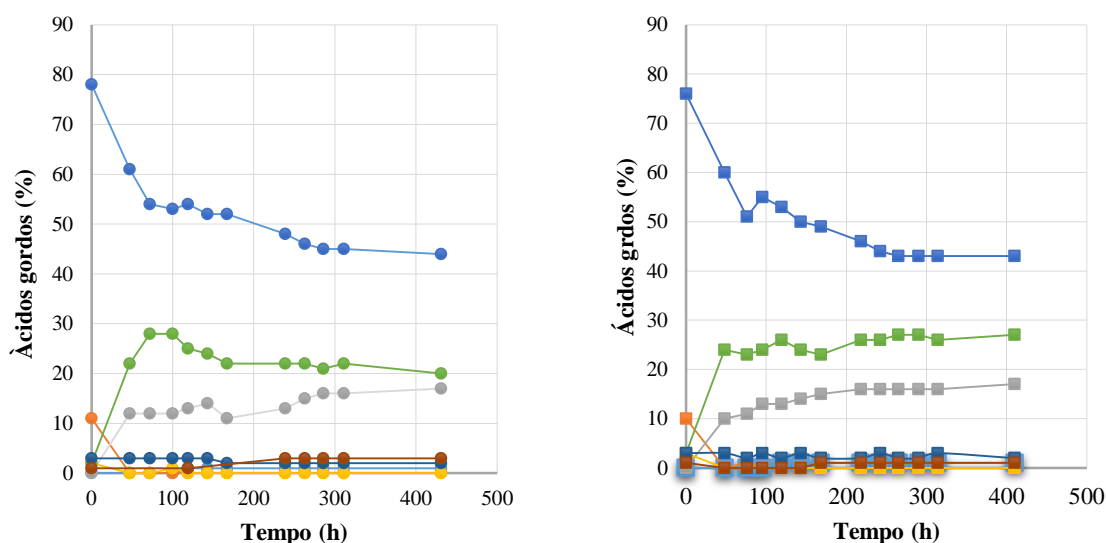


Figura 4.10- Variação da composição em ácidos gordos dos lípidos na biomassa de *R. toruloides* (●) e de *R. mucilaginosa* (■) ao longo do processo fermentativo (T=30 °C; 150 rpm; biomassa_i = 100 mg/L; glicerol_i = 7,5 g/L) (● C14:0; ● C16:0; ● C16:1; ● C18:0; ● C18:1; ● C18:2; ● C18:3; ● C24:0).

Através dos perfis lipídicos constatou-se que o perfil dos ácidos gordos não variou muito significativamente ao longo do tempo de fermentação em presença de glicerol. No entanto, as células provenientes do crescimento em glucose no pré-inóculo apresentavam diferenças mais significativas no seu perfil, com concentrações mais elevadas de C18:1 e C16:0 e menores de C16:1 e C18:2. Efetivamente, não era esperada variação do perfil em AG, uma vez que outros estudos haviam já

mostrado que a composição de AG para a *R. toruloides* é independente do tempo de fermentação e da concentração de glicerol inicial (Papanikolaou *et al.*, 2017), tendo demonstrado que este tipo de microrganismos tende a produzir lípidos substancialmente mais insaturados, tal como ocorreu neste trabalho (**Figura 4.10**). No entanto, outros autores (Sawangkeaw e Ngamprasertsith, 2013; Leiva-Candia *et al.*, 2014; Papanikolaou *et al.*, 2017; Patel *et al.*, 2017) reportaram teores mais significativos de ácido palmítico (C16:0) e menos significativos de ácido palmitoleico, quando comparando com os resultados da **Figura 4.10**.

Tendo em conta a possibilidade de produção de biodiesel usando esta biomassa como matéria-prima para (trans)esterificação *in situ*, evidencia-se que a percentagem de ácido linolénico (C18:3 - 2,5%) presente é inferior ao limite máximo especificado na norma EN 14214 (< 12 % m/m).

O desenvolvimento em glicerol das leveduras oleaginosas estudadas apresentou-se muito aquém das expectativas e dos resultados descritos na literatura, refletindo-se também nos parâmetros cinéticos calculados para esse ensaio. O facto de o pré-inóculo ter sido realizado num meio onde a fonte de carbono utilizada era diferente (glucose) poderá ter sido um dos principais fatores responsáveis pela baixa atividade da *R. toruloides* e *R. mucilaginosa*, em meio de glicerol, visto que a maquinaria celular estaria mais apta para a assimilação de glucose e não de glicerol.

Capítulo 5 – Conclusões e Trabalho Futuro

A glicerina não refinada proveniente de processos de produção de biodiesel possui características que permitem a sua valorização através da sua utilização como matéria-prima para a produção de biodiesel e bioetanol, num contexto de biorrefinaria.

No entanto, as características da glicerina não refinada são dependentes do material de partida do processo produtivo que lhe deu origem assim como das condições em que se realizou esse mesmo processo. A caracterização das amostras de glicerina não refinada cedidas para este trabalho permitiu concluir que as mesmas eram resultantes da conversão de óleos vegetais por transesterificação básica, processo mais utilizado pelas indústrias nacionais de produção de biodiesel. A separação dos ácidos gordos presentes na glicerina não refinada, sob a forma de sabões, foi realizada num processo de acidificação/neutralização seguido de separação das fases obtidas por centrifugação. Tendo-se utilizado vários ácidos (HCl, HNO₃, H₃PO₄ e H₂SO₄) neste passo de pré-tratamento concluiu-se que a adição de HCl para uma redução do valor de pH da glicerina não refinada para 5, permite obter uma fase rica em glicerol (recuperação de 94,6%) e uma fase orgânica contendo 75% de ácidos gordos livres (AGL).

A caracterização da glicerina pré-tratada (teor em glicerol - $69,0 \pm 0,9$ % m/m, cinzas - $4,14 \pm 0,03$ % m/m, metanol - $12,27 \pm 0,10$ % m/m, água - $7,30 \pm 0,42$ % m/m e MONG - $19,5 \pm 0,4$ % m/m) demonstrou que o processo de pré-tratamento não foi eficaz relativamente ao aumento de pureza da glicerina na fase tendo, no entanto, sido observada uma redução no nível de alguns parâmetros contaminantes importantes para os processos fermentativos realizados posteriormente.

Para além disso, na fase orgânica rica em AGL, a caracterização do perfil em ácidos gordos demonstrou que a percentagem de ácido linolénico, bem como a de ácidos gordos polinsaturados (≥ 4 duplas ligações - $<0,95$ % m/m) são inferiores aos limites especificados na norma EN 14214, 12 % m/m e 1 % m/m respetivamente, viabilizando a sua utilização como matéria-prima para a produção de biodiesel, no que respeita a estes parâmetros. Face ao elevado valor de índice de acidez desta fase ($58,17 \pm 0,72$ mg KOH/g), que traduz uma elevada quantidade de ácidos gordos livres presentes, para a conversão desta matéria-prima em ésteres metílicos (FAME - biodiesel) dever-se-ia utilizar um processo de catálise ácida.

Na avaliação da viabilidade de produção de etanol a partir de 7,5 g/L de glicerina não refinada tratada a pH 5 com HCl, verificou-se que, das 4 testadas, as leveduras *P. stipitis* e *S. uvarum* foram as que melhor responderam à presença desta fonte de carbono, atingindo ao longo do tempo de fermentação níveis de crescimento bastante mais elevados ($DO_{640nm} \sim 14$). Contudo, constatou-se que não ocorreu processo fermentativo pois obtiveram-se concentrações insignificantes de produto (< 250 mg/L). Esta observação foi confirmada pelo facto de também não se ter detetado, em geral, presença de ácido acético no meio de fermentação.

Na avaliação da viabilidade da produção de biomassa rica em óleo por conversão da glicerina não refinada, verificou-se que as leveduras *R. toruloides* e *R. mucilaginosa* apresentaram rendimentos de conversão em biomassa de aproximadamente 50%. No entanto, os teores de ácidos gordos presentes na biomassa no final do processo eram cerca de 20% do inicial revelando que a adaptação das células para utilização de glicerol se fez à custa de alteração do metabolismo lipídico. No entanto, esta biomassa apresentava uma percentagem de ácido linolénico (C18:3 - 2,5%) inferior ao limite máximo especificado

na norma EN 14214 ($< 12 \text{ \% m/m}$), pelo que em termos desses parâmetros esta seria viável como matéria-prima para a produção de biodiesel por (trans)esterificação *in situ*.

Em conclusão, pode afirmar-se que, apesar dos resultados obtidos neste trabalho não terem sido muito significativos e promissores, a glicerina não refinada ainda poderá ser encarada como matéria-prima nos processos produtivos de biodiesel e bioetanol embora exista um longo trabalho de investigação a desenvolver, nomeadamente nos seguintes aspetos:

- Otimização do processo de separação das fases ricas em glicerol e AGL, uma vez que existem perdas na etapa de separação das fases, após acidificação.
- Alteração das condições para realização dos ensaios fermentativos, nomeadamente por adaptação das leveduras ao glicerol fazendo o seu desenvolvimento prévio em pré-inóculos sucessivos com concentrações crescentes da fonte de carbono e testando outros microrganismos ou mesmo utilizando leveduras geneticamente modificadas.

Capítulo 6 – Referências Bibliográficas

- Acheampong, M., Ertem, F. C., Kappler, B., Neubauer, P. (2017). In pursuit of Sustainable Development Goal (SDG) number 7: Will biofuels be reliable?. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 75(7), 927–937. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.074>
- Adnan, N. A. A., Suhaimi, S. N., Abd-Aziz, S., Hassan, M. A., Phang, L. Y. (2014). Optimization of bioethanol production from glycerol by *Escherichia coli* SS1. *Renewable Energy*, 66, 625–633. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2013.12.032>
- Ahmad, A. L., Yasin, N. H. M., Derek, C. J. C., Lim, J. K. (2011). Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(1), 584–593. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.09.018>
- Almeida, J. R. M., Fávaro, L. C. L., Quirino, B. F. (2012). Biodiesel biorefinery: opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 48. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-48>
- Anderson, E., Addy, M., Xie, Q., Ma, H., Liu, Y., Cheng, Y., Ruan, R. (2016). Glycerin esterification of scum derived free fatty acids for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 200, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.018>
- Anuar, M. R., Abdullah, A. Z. (2016). Challenges in biodiesel industry with regards to feedstock, environmental, social and sustainability issues: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 208–223. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.296>
- Aranda, D. A. G., Santos, R. T. P., Tapanes, N. C. O., Ramos, A. L. D., Antunes, O. A. C. (2008). Acid-catalyzed homogeneous esterification reaction for biodiesel production from palm fatty acids. *Catalysis Letters*, 122(1–2), 20–25. <https://doi.org/10.1007/s10562-007-9318-z>
- Ardi, M. S., Aroua, M. K., Hashim, N. A. (2015). Progress, prospect and challenges in glycerol purification process: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 1164–1173. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.091>
- Barometer, B. (2016). *Biofuels Barometer* (July 2017).
- Canesin, E. A., de Oliveira, C. C., Matsushita, M., Felicidade Dias, L., Reghiany Pedro, M., de Souza, N. E. (2014). Characterization of residual oils for biodiesel production. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2013.12.007>
- Chang, W. R., Hwang, J. J., Wu, W. (2017). Environmental impact and sustainability study on biofuels for transportation applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 67, 277–288. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.020>
- Chen, Z., Liu, D. (2016). Toward glycerol biorefinery: metabolic engineering for the production of biofuels and chemicals from glycerol. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0625-8>
- Ciriminna, R., Pina, C. Della, Rossi, M., Pagliaro, M. (2014). Understanding the glycerol market. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(10), 1432–1439. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400229>

- Clomburg, J. M., Gonzalez, R. (2013). Anaerobic fermentation of glycerol: A platform for renewable fuels and chemicals. *Trends in Biotechnology*, 31(1), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.10.006>
- Dhabhai, R., Ahmadifeijani, E., Dalai, A. K., Reaney, M. (2016). Purification of crude glycerol using a sequential physico-chemical treatment, membrane filtration, and activated charcoal adsorption. *Separation and Purification Technology*, 168, 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.05.030>
- Djurisic-Mladenovic, N., Predojevic, Z., Skrbic, B. (2016). Conventional and advanced liquid biofuels. *Hemijaska industrija*, 70(3), 225–241. <https://doi.org/10.2298/HEMIND150311029D>
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., Strub, C., Schorr-Galindo, S. (2014). Single cell oils (SCOs) from oleaginous yeasts and moulds: Production and genetics. *Biomass and Bioenergy*, 68(4), 135–150. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.06.016>
- Dutta, K., Daverey, A., Lin, J. G. (2014). Evolution retrospective for alternative fuels: First to fourth generation. *Renewable Energy*, 69, 114–122. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.02.044>
- El-Dalatony, M., Salama, E.-S., Kurade, M., Hassan, S., Oh, S.-E., Kim, S., Jeon, B.-H. (2017). Utilization of Microalgal Biofractions for Bioethanol, Higher Alcohols, and Biodiesel Production: A Review. *Energies*, 10(12), 2110. <https://doi.org/10.3390/en10122110>
- ENMC. (2017). Biocombustíveis no Mundo.
- Gangil, S., Mewar, C., Singh, R. K., Modhera, B. (2015). Influence of acid catalyst on two step transesterification of Karanja oil with high free fatty acids. *Biofuels*, 6(5–6), 377–381. <https://doi.org/10.1080/17597269.2015.1110778>
- Gao, Z., Ma, Y., Wang, Q., Zhang, M., Wang, J., Liu, Y. (2016). Effect of crude glycerol impurities on lipid preparation by *Rhodospiridium toruloides* yeast 32489. *Bioresource Technology*, 218, 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.088>
- Gargalo, C. L., Cheali, P., Posada, J. A., Gernaey, K. V., Sin, G. (2016). Economic Risk Assessment of Early Stage Designs for Glycerol Valorization in Biorefinery Concepts. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 55(24), 6801–6814. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b04593>
- Go, A. W., Sutanto, S., Ong, L. K., Tran-Nguyen, P. L., Ismadji, S., Ju, Y. H. (2016). Developments *in in-situ* (trans) esterification for biodiesel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 69, 284–305. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.01.070>
- Hájek, M., Skopal, F. (2010). Treatment of glycerol phase formed by biodiesel production. *Bioresource Technology*, 101(9), 3242–3245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.094>
- Halder, S., Dhawane, S. H., Kumar, T., Halder, G. (2015). Acid-catalyzed esterification of castor (*Ricinus communis*) oil: optimization through a central composite design approach. *Biofuels*, 6(3–4), 191–201. <https://doi.org/10.1080/17597269.2015.1078559>
- Haq, F., Ali, H., Shuaib, M., Badshah, M., Hassan, S. W., Munis, M. F. H., Chaudhary, H. J. (2016). Recent progress in bioethanol production from lignocellulosic materials: A review. *International Journal of Green Energy*, 13(14), 1413–1441. <https://doi.org/10.1080/15435075.2015.1088855>
- Hayes, C. J., Burgess, D. R., Manion, J. A. (2015). Combustion Pathways of Biofuel Model Compounds: A Review of Recent Research and Current Challenges Pertaining to First-, Second-, and Third-

Generation Biofuels. *Advances in Physical Organic Chemistry*, 49, 103-187
<https://doi.org/10.1016/bs.apoc.2015.09.001>

He, Q., McNutt, J., Yang, J. (2017). Utilization of the residual glycerol from biodiesel production for renewable energy generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71(January 2016), 63–76.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.110>

Hu, S., Luo, X., Wan, C., Li, Y. (2012). Characterization of crude glycerol from biodiesel plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5915–5921. <https://doi.org/10.1021/jf3008629>

INE. (2016). *Estatísticas do Ambiente 2016*.

Julianto, T. S., Suratmi. (2017). The effect of concentrations and volumes of methanol in reducing free fatty acid content of used cooking oil as biodiesel feedstock. *AIP Conference Proceedings*, 1823.
<https://doi.org/10.1063/1.4978203>

Kasim, F. H., Harvey, A. P., Zakaria, R. (2010). Biodiesel production by in situ transesterification. *Biofuels*, 1(2), 355–365. <https://doi.org/doi:10.4155/bfs.10.6>

Kayode, B., Hart, A. (2017). An overview of transesterification methods for producing biodiesel from waste vegetable oils. *Biofuels*, 7269, 1–19. <https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1306683>

Klein, M., Carrillo, M., Xiberras, J., Islam, Z. ul, Swinnen, S., Nevoigt, E. (2016). Towards the exploitation of glycerol's high reducing power in *Saccharomyces cerevisiae*-based bioprocesses. *Metabolic Engineering*, 38, 464–472. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.10.008>

Kong, P. S., Aroua, M. K., Daud, W. M. A. W. (2016). Conversion of crude and pure glycerol into derivatives: A feasibility evaluation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 63, 533–555.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.05.054>

Kostik, V., Memeti, S., Bauer, B. (2013). Fatty acid composition of edible oils and fats. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 4, 112–116.

Kurnia, J. C., Jangam, S. V., Akthar, S., Sasmito, A. P., Mujumdar, A. S. (2016). Advances in biofuel production from oil palm and palm oil processing wastes: A review. *Biofuel Research Journal*, 9, 332–346. <https://doi.org/10.18331/BRJ2016.3.1.3>

Leiva-Candia, D. E., Pinzi, S., Redel-Macías, M. D., Koutinas, A., Webb, C., Dorado, M. P. (2014). The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. *Fuel*, 123, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.01.054>

Leung, D. Y. C., Wu, X., Leung, M. K. H. (2010). A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy*, 87(4), 1083-1095. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.10.006>

Lima, A. L. de, Ronconi, C. M., Mota, C. J. A. (2016). Heterogeneous basic catalysts for biodiesel production. *Catalysis Science Technology*, 6(9), 2877–2891. <https://doi.org/10.1039/C5CY01989C>

Liu, L-P., Hu, Y., Lou, W-Y., Li, N., Wu, H., Zong, M-H. (2017). Use of Crude Glycerol as Sole Carbon Source for Microbial Lipid Production by Oleaginous Yeasts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(2), 495–510. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2340-0>

Luo, X., Ge, X., Cui, S., Li, Y. (2016). Value-added processing of crude glycerol into chemicals and polymers. *Bioresource Technology*, 215, 144-154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.042>

- Mahmudul, H. M., Hagos, F. Y., Mamat, R., Adam, A. A., Ishak, W. F. W., Alenezi, R. (2017). Production, characterization and performance of biodiesel as an alternative fuel in diesel engines – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 72 (Janeiro), 497–509. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.01.001>
- Marx, S. (2016). Glycerol-free biodiesel production through transesterification: A review. *Fuel Processing Technology*, 151, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.05.033>
- Miranda, J. R., Passarinho, P. C., Gouveia, L. (2012). Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: the influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(2), 555–564. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4338-z>
- Mishra, V. K., Goswami, R. (2017). A review of production, properties and advantages of biodiesel. *Biofuels*, 9(2), 273–289. <https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1336350>
- Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10 (Novembro 2016), 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003>
- Munch, G., Sestric, R., Sparling, R., Levin, D. B., Cicek, N. (2015). Lipid production in the under-characterized oleaginous yeasts, *Rhodospiridium babjevae* and *Rhodospiridium diobovatum*, from biodiesel-derived waste glycerol. *Bioresource Technology*, 185, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.051>
- Muniru, O. S., Ezeanyanoso, C. S., Fagbemigun, T. K., Akubueze, E. U., Oyewole, A. O., Okunola, O. J., Asieba, G., Shifatu, A. O., Igwe, C. C., Elemo, G. N. (2016). Valorization of Biodiesel Production: Focus on Crude Glycerine Refining/Purification. *Journal of Scientific Research Reports*, 11(512), 1–8. <https://doi.org/10.9734/JSRR/2016/27982>
- Nanda, M., Yuan, Z., Qin, W. (2014). Purification of crude glycerol using acidification: effects of acid types and product characterization. *Austin Journal of Chemical Engineering*, 1(1), 7 [http://flash.lakeheadu.ca/~wqin/website/papers/nov 14/2014 Malaya Austin Journal Paper.pdf](http://flash.lakeheadu.ca/~wqin/website/papers/nov%2014/2014%20Malaya%20Austin%20Journal%20Paper.pdf)
- Nayyar, A., Walker, G., Wardrop, F., Adya, A. K. (2017). Flocculation in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*: role of cell wall polysaccharides and lectin-like receptors. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(2), 211–218. <https://doi.org/10.1002/jib.421>
- Noureddin, A., Shirazi, M. M. A., Tofeily, J., Kazemi, P., Motae, E., Kargari, A., Mostafaei, M., Akia, M., Karout, A., Jaber, R., Hamieh, T., Tabatabaei, M. (2014). Accelerated decantation of biodiesel-glycerol mixtures: Optimization of a critical stage in biodiesel biorefinery. *Separation and Purification Technology*, 132, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.05.011>
- Pacheco, C., Palla, C., Crapiste, G. H., Carrín, M. E. (2014). Simultaneous Quantitation of FFA, MAG, DAG, and TAG in Enzymatically Modified Vegetable Oils and Fats. *Food Analytical Methods*, 7(10), 2013–2022. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9830-x>
- Pal, P., Chaurasia, S. P. (2016). Characterization of Crude and Purified Glycerol from Biodiesel Production and Purification Techniques. Em Vth International Symposium on “Fusion of Science Technology (393–397).
- Papanikolaou, S., Kampsisopoulou, E., Blanchard, F., Rondags, E., Gardeli, C., Koutinas, A. A., Aggelis, G., Chevalot, I. (2017). Production of secondary metabolites through glycerol fermentation under

- carbon-excess conditions by the yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Rhodospiridium toruloides*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 1600507, 1–16. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201600507>
- Papanikolaou, S., Kampsopoulou, E., Blanchard, F., Rondags, E., Gardeli, C., Koutinas, A. A., Aggelis, G., Chevalot, I. (2017). Conversion of biodiesel-derived glycerol into biotechnological products of industrial significance by yeast and fungal strains. *Engineering in Life Sciences*, 17(3), 262–281. <https://doi.org/10.1002/elsc.201500191>
- Patel, A., Arora, N., Mehtani, J., Pruthi, V., Pruthi, P. A. (2017). Assessment of fuel properties on the basis of fatty acid profiles of oleaginous yeast for potential biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 77(May 2016), 604–616. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.04.016>
- Photaworn, S., Tongurai, C., Kungsanunt, S. (2017). Process development of two-step esterification plus catalyst solution recycling on waste vegetable oil possessing high free fatty acid. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 118, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2017.04.013>
- Polburee, P., Yongmanitchai, W., Lertwattanasakul, N., Ohashi, T., Fujiyama, K., Limtong, S. (2015). Characterization of oleaginous yeasts accumulating high levels of lipid when cultivated in glycerol and their potential for lipid production from biodiesel-derived crude glycerol. *Fungal Biology*, 119(12), 1194–1204. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.09.002>
- Quispe, C. A. G., Coronado, C. J. R., Carvalho, J. A. (2013). Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 475–493. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.017>
- Rajagopal, K., Bindu, C., Prasad, R. B. N., Ahmad, A. (2016). Environmental Effects The effect of fatty acid profiles of biodiesel on key fuel properties of some biodiesels and blends. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 38(11), 1582–1590. <https://doi.org/10.1080/15567036.2014.929758>
- REN21. (2016). *Renewables 2016: Global Status Report*. [https://doi.org/ISBN 978-3-9818107-0-7](https://doi.org/ISBN%20978-3-9818107-0-7)
- REN21. (2017). *Renewables 2017: Global status report*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.082>
- Reşitoğlu, İ. A., Keskin, A. (2017). Biodiesel production from free fatty acids and the effects of its blends with alcohol–diesel on engine characteristics. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 19(3), 925–931. <https://doi.org/10.1007/s10098-016-1255-3>
- Rivaldi, J. D., Duarte, L. C., Rodrigues, R. de C. L. B., Filho, H. J. I., Felipe, M. das G. de A., de Mancilha, I. M. (2017). Valorization of glycerol from biodiesel industries as a renewable substrate for co-producing probiotic bacteria biomass and acetic acid. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 7(1), 81–90. <https://doi.org/10.1007/s13399-016-0216-8>
- Rodrigues, C. V., Santana, K. O., Nespeca, M. G., Eduardo de Oliveira, J., Maintinguer, S. I. (2016). Crude glycerol by transesterification process from used cooking oils: Characterization and potentialities on hydrogen bioproduction. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(33), 14641–14651. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.209>
- Saladini, F., Patrizi, N., Pulselli, F. M., Marchettini, N., Bastianoni, S. (2016). Guidelines for energy evaluation of first, second and third generation biofuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 66(September 2015), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.073>

- Sarris, D., Papanikolaou, S. (2016). Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies. *Engineering in Life Sciences*, 16, 307-329. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400199>
- Sawangkeaw, R., Ngamprasertsith, S. (2013). A review of lipid-based biomasses as feedstocks for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 25, 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.04.007>
- Schultz, E. L., de Souza, D. T., Damaso, M. C. T. (2014). The glycerol biorefinery: a purpose for Brazilian biodiesel production. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 1(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40538-014-0007-z>
- Sebastian, J., Muraleedharan, C., Santhiagu, A. (2016). A comparative study between chemical and enzymatic transesterification of high free fatty acid contained rubber seed oil for biodiesel production. *Cogent Engineering*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.1080/23311916.2016.1178370>
- Shi, J., Zhang, M., Zhang, L., Wang, P., Jiang, L., Deng, H. (2014). Xylose-fermenting *Pichia stipitis* by genome shuffling for improved ethanol production. *Microbial Biotechnology*, 7(2), 90–99. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12092>
- Sivasankaran, C., Ramanujam, P. K., Balasubramanian, B., Mani, J. (2016). Recent progress on transforming crude glycerol into high value chemicals: a critical review. *Biofuels*. <https://doi.org/10.1080/17597269.2016.1174018>
- Skrzyńska, E., Wondolowska-Grabowska, A., Capron, M., Dumeignil, F. (2014). Crude glycerol as a raw material for the liquid phase oxidation reaction. *Applied Catalysis A: General*, 482, 245–257. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.apcata.2014.06.005>
- Spier, F., Buffon, J. G., Burkert, C. A. V. (2015). Bioconversion of Raw Glycerol Generated from the Synthesis of Biodiesel by Different Oleaginous Yeasts: Lipid Content and Fatty Acid Profile of Biomass. *Indian Journal of Microbiology*, 55(4), 415–422. <https://doi.org/10.1007/s12088-015-0533-9>
- Su, Y., Zhang, P., Su, Y. (2015). An overview of biofuels policies and industrialization in the major biofuel producing countries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 991–1003. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.04.032>
- Tan, H. W., Abdul Aziz, A. R., Aroua, M. K. (2013). Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 27, 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.035>
- Thomas, K. C., Hynes, S. H., Ingledew, W. M. (2002). Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1616–1623. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1616>
- Thompson, J. C., He, B. B. (2006). Characterization of crude glycerol from biodiesel production from Multiple feedstocks. *American Society of Agricultural and Biological Engineer* 22(2), 261–265. <https://doi.org/10.1021/jf3008629>
- Vávra, A., Hájek, M., Skopal, F. (2017). The removal of free fatty acids from methyl ester. *Renewable Energy*, 103, 695–700. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.10.084>
- Wan Isahak, W. N. R., Che Ramli, Z. A., Ismail, M., Mohd Jahim, J., Yarmo, M. A. (2015). Recovery and Purification of Crude Glycerol from Vegetable Oil Transesterification. *Separation Purification Reviews*, 44(3), 250–267. <https://doi.org/10.1080/15422119.2013.851696>

- Wei, N., Oh, E. J., Million, G., Cate, J. H. D., Jin, Y. S. (2015). Simultaneous Utilization of Cellobiose, Xylose, and Acetic Acid from Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production by an Engineered Yeast Platform. *ACS Synthetic Biology*, 4(6), 707–713. <https://doi.org/10.1021/sb500364q>
- Wu, J., Elliston, A., Le Gall, G., Colquhoun, I. J., Collins, S. R. A., Dicks, J., Roberts, I., Waldron, K. W. (2017). Yeast diversity in relation to the production of fuels and chemicals. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14641-0>
- Yu, K. O., Kim, S. W., Han, S. O. (2010). Engineering of glycerol utilization pathway for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 101(11), 4157–4161. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.066>
- Zabed, H., Sahu, J. N., Suely, A., Boyce, A. N., Faruq, G. (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 71(October 2015), 475–501. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>
- Zhang, M., Wu, H. (2015). Effect of major impurities in crude glycerol on solubility and properties of glycerol/methanol/bio-oil blends. *Fuel*, 159(June), 118–127. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.06.062>

Anexo I – Reagentes

Os reagentes utilizados no decorrer deste trabalho encontram-se descritos na Tabela I.1.

Tabela I.1- Lista de reagentes químicos utilizados no decorrer do trabalho experimental (CG-cromatografia gasosa, FAME-determinação de ésteres metílicos de ácidos gordos, Q – método químico, HPLC- cromatografia líquida de alta pressão)

Nome	Fórmula Química	Massa Molecular (g/mol)	Pureza (%)	Marca	Ensaio
Acetona	C ₃ H ₆ O	58,08	99,5	Sigma-Aldrich	Sabões (Q)
Ácido acético	CH ₃ COOH	60,05	100	Merck	HPLC
Ácido clorídrico	HCl	36,46	37	Sigma-Aldrich	Acidificação
Ácido clorídrico (0,1N)	HCl	36,46	Solução padrão	Sigma-Aldrich	Glicerol (Q)
Ácido clorídrico (0,5N)	HCl	36,46	-	Panreac	Sabões (Q)
Ácido fosfórico	H ₃ PO ₄	98,00	85	Panreac	Acidificação
Agar	-	-	-	Panreac	Repicagem
Ácido nítrico	HNO ₃	63,01	65	Panreac	Acidificação
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	98,08	95-97	Sigma-Aldrich	Acidificação
Ácido sulfúrico (0,5N)	H ₂ SO ₄	98,08	Solução padrão	Sigma-Aldrich	Glicerol (Q)
Azul de bromofenol	C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S	-	-	M B	Sabões (Q)
Cloreto de sódio	NaCl	58,44	99,5-100,5	Panreac	Ácidos gordos (Q)
D-Glucose (anidro)	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16	99,5	Pronalab	Repicagem e Cultura
Dihidrogenofosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	174,18	99	Panreac	Cultura
Etanol	C ₂ H ₅ OH	46,07	99	Carlo Erba	Acidez (Q), Etanol (CG e HPLC)
Éter etílico	C ₂ H ₅ OC ₂ H ₅	74,12	99,5	Absolve	Acidez (Q)
Etilenoglicol	C ₂ H ₆ O ₂	62,07	99,5	Merck	Glicerol (Q)
Extrato de levedura	-	-	-	DIFCO	Repicagem e Cultura
Extrato de malte	-	-	-	DIFCO	Repicagem
Glicerol	C ₂ H ₈ O ₃	92,19	>99,5%		Glicerol (Q; HPLC)
Heptadecanoato de metilo	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	284,48	99,5	Sigma-Aldrich	FAME (CG)
Hidróxido de potássio	KOH	56,11	86	José Manuel Gomes dos Santos	Acidez (Q)

Hidróxido de sódio	NaOH	40,00	99,3	José Manuel Gomes dos Santos	Glicerol (Q) e Ácidos gordos (Q)
Iso-octano	C ₈ H ₁₈	114,23	99,5	Panreac	Ácidos gordos (Q)
Metanol	CH ₃ OH	32,04	99,9	Merck	Metanol (CG), Ácidos gordos (Q)
Periodato de sódio	NaIO ₄	213,89	99	Acros Organics	Glicerol (Q)
Peptona	-	-	-	Panreac	Cultura
Solução de fenolftaleína	C ₂₀ H ₁₄ O ₄	318,33	-	AJL	Acidez (Q)
Solução metanólica de trifluoreto de boro	C ₂ H ₈ BF ₃ O ₂	131,89	13-15	Riedel-de-Haën	Ácidos gordos (Q)
Sulfato de amónio	(NH ₄) ₂ SO ₄	132,14	99,5	Merck	Cultura
Sulfato de magnésio (heptahidratado)	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	246,48	99,5	Merck	Cultura
Sulfato de sódio (anidro)	Na ₂ SO ₄	142,04	96	Merck	Ácidos gordos (Q)
2-Propanol	C ₃ H ₈ O	60,10	99,9	Merck	Etanol (CG)

Anexo II – Equipamentos

Os equipamentos utilizados nos métodos deste estudo assim como as respetivas marcas são apresentados na lista abaixo:

- Agitador de vórtice (*Janke Kunkel*, VF2);
- Agitador magnético (*VELP Scientifica*);
- Aparelho Karl Fischer coulométrico (*Metrohm*, 831 KF coulometer)
- Autoclave (*Newclave*, HL-36AC);
- Balança de precisão (*Mettler Toledo*, AB204-S);
- Banho termostatzado (*P Selecta*, Precistern)
- Câmara de fluxo laminar (*CRUMA*; Captair);
- Centrifuga de bancada (*VWR*, Himac CT15E,);
- Centrifuga (*Thermo Scientific*, Multifuge 3SR+)
- Cromatógrafo gasoso com injetor automático (*Varian*, CP-3800);
- Cromatógrafo gasoso (*Hewlett Packard* , HP 5890,);
- Espectrofotómetro (*Hitachi*, U-2000);
- Estufa (*Memmert*);
- Estufa com ventilação (*Memmert*, ULE500);
- HPLC com injetor automático (*Agilent* 1100 Series);
- Incubadora (*New Brunswick Scientific*, G25,);
- Medidor de pH (*WTW*, Inolab pH level 2);
- Mufla (*Nabertherm*; LE 6/11/R7);
- Rotavapor com banho de aquecimento e controlador de vácuo (*BÜCHI*, B-490, R-200 e V 800);
- Sistema de purificação de água (*Millipore*, Elix 5).